

Université de Montréal

**Caractérisation de l'effet fibroprolifératif induit par la libération paracrine  
de peptides issus de l'apoptose endothéliale**

par  
Patrick Laplante

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Biologie Moléculaire

Août 2004

© Patrick Laplante, 2004



QH

506

U54

2005

V. 008

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

ce mémoire intitulé :  
**Caractérisation de l'effet fibroprolifératif induit par la libération paracrine  
de peptides issus de l'apoptose endothéliale**

présenté par :  
Patrick Laplante

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Anne-Marie Mes-Masson, président-rapporteur

Marie-Josée Hébert, directeur de recherche

Lambert Busque, membre du jury

## RÉSUMÉ

L'apoptose endothéliale est un évènement initial dans le développement de la sclérose systémique. Cette pathologie fibrotique est associée au développement d'un phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste et à une différenciation myofibroblastique persistante. La relation mécanistique entre l'apoptose des cellules endothéliales (CE) et la fibrose était, jusqu'à ce jour, mal définie. Nous avons donc posé l'hypothèse que l'apoptose endothéliale initie la relâche de médiateurs paracrins fibrotiques. Le milieu conditionné par des CE apoptotiques (SSC) est en mesure d'induire un état de résistance à l'apoptose chez le fibroblaste et une différenciation myofibroblastique, le tout sous contrôle de l'activité phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase. Un fragment du domaine V du perlécan a été identifié comme l'un des médiateurs fibrotiques actifs présents dans le milieu SSC. Des fibroblastes humains dérivés de lésions sclérodermiques sont plus sensibles à l'activité anti-apoptotique des composantes retrouvées sur ce fragment (motif EGF et sulfate de chondroïtine) que des fibroblastes contrôles normaux. Ces résultats suggèrent qu'une apoptose endothéliale soutenue et/ou une sensibilité accrue des fibroblastes aux médiateurs produits par des CE apoptotiques pourraient être à la base des processus de réparation infructueux caractéristiques aux pathologies fibrotiques.

### Mots clés

Remodelage fibrotique, survie cellulaire, Bim, Bcl-Xl, myofibroblaste, alpha actine musculaire lisse, PI3K, perlécan, sulfate de chondroïtine

## ABSTRACT

Endothelial apoptosis has been implicated as a primary event in systemic sclerosis. This fibrotic disease is associated with the development of an anti-apoptotic phenotype in fibroblasts and myofibroblast differentiation. Although, the mechanistic interplay between apoptosis of endothelial cells (EC) and fibrosis remain largely undefined. We tested the hypothesis that endothelial apoptosis initiate the releases of paracrine fibrogenic mediators. Medium conditioned by apoptotic EC (SSC) inhibits apoptosis of fibroblast and induces myofibroblast differentiation by a phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase dependant mechanism. A fragment of the domain V of perlecan was identified as one of the active fibrogenic mediators present in SSC. Human fibroblasts derived from systemic sclerosis skin lesions were found to be more sensitive to the anti-apoptotic activity of the motifs present on this fragment (EGF motif and chondroitine sulfate) than fibroblasts derived from normal controls. These results suggest that a sustained increase in endothelial apoptosis and/or increased sensitivity of fibroblasts to mediators produced by apoptotic EC could form the basis of a maladaptive healing process characteristic of fibrotic diseases.

### Key words

Fibrotic remodeling, cell survival, Bim, Bcl-Xl, myofibroblast, alpha smooth muscle actin, PI3K, perlecan, chondroitine sulfate

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b>	III
<b>ABSTRACT</b>	IV
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	V
<b>LISTE DES FIGURES</b>	VIII
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	IX
<b>1. INTRODUCTION</b>	1
<b>1.1. MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE</b>	2
1.1.1. Aperçu	2
1.1.2. Apoptose	3
1.2.2.1. Caspases (l'exécuteur) et leurs substrats	4
1.2.2.2. Famille Bcl-2	5
1.2.2.3. Voie intrinsèque	8
1.2.2.4. Voie extrinsèque	11
1.1.3. Autres MCP	15
1.1.4. Nécrose	16
1.1.5. Désordres de la mort cellulaire	17
<b>1.2. INSULTE VASCULAIRE, RÉPARATION ET FIBROSE</b>	18
1.2.1. Aperçu	18
1.2.1.1. Apoptose des cellules endothéliales	19
1.2.1.1.1. Oxyde nitreux	20
1.2.1.1.2. Facteurs de risque pour la transplantation	21

1.2.1.1.3. Anticorps anti-cellules endothéliales	21
1.2.1.2. Réparation vs Fibrose	22
1.2.2. Pathologies liées à une dysfonction de l'endothélium	23
1.2.2.1. Sclérose systémique	25
1.3. SYSTÈME VASCULAIRE	29
1.3.1. Composantes des vaisseaux sanguins	29
1.3.1.1. L'endothélium	30
1.3.1.2. La membrane basale	31
1.3.1.3. Les cellules musculaires lisses	35
1.3.1.4. Les fibroblastes	36
1.3.1.5. Le myofibroblaste	38
1.3.1.5.1. Caractéristiques	39
1.3.1.5.2. Rôles	41
1.3.1.5.3. Voies d'activation	44
1.3.1.6. Matrice extracellulaire	46
1.3.1.6.1. Composantes	47
1.3.1.6.2. Interactions cellule-matrice extracellulaire	49
1.3.1.6.3. Les intégrines	50
1.3.1.6.3.1. Intégrine vs apoptose	52
1.3.1.6.3.2. Intégrine vs	
Différenciation myofibroblastique	53
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	55
2.1. PRÉMISSSES	56



2.2. HYPOTHÈSE	57
2.3. OBJECTIFS	58
<b>3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b>	<b>59</b>
3.1. ARTICLE #1	
Apoptosis of endothelial cells triggers the release of cryptic mediators : a novel pathway for initiation of fibrosis	60
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>101</b>
<b>5. CONCLUSION</b>	<b>129</b>
<b>6. RÉFÉRENCES</b>	<b>133</b>

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

Figure 1. Schéma global des voies apoptotiques	14
Figure 2. Représentation schématique de la structure du perlécan	34
Figure 3. Représentation classique de la différenciation myofibroblastique	42

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX (article #1)

Figure 1. Mediators produced by apoptotic EC induce resistance to apoptosis in human fibroblasts	95
Figure 2. Molecular regulation of resistance to apoptosis in fibroblasts induced by mediators produced by apoptotic EC	96
Figure 3. Regulation of apoptosis of fibroblasts by motifs present on the domain V of perlecan	97
Figure 4. Endothelial apoptosis induces myofibroblast differentiation of human fibroblasts	98
Figure 5. Systemic sclerosis fibroblasts are more sensitive to mediators produced by apoptotic EC than normal fibroblasts	99
Figure 6. Schematic diagram	100

### DISCUSSION

Figure 4. La différenciation myofibroblastique induite par le TGF- $\beta$ 1	122
Figure 5. La différenciation myofibroblastique induite suite à l'apoptose endothéliale	123

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$ -SMA	: alpha smooth muscle actin
a.a.	: acides aminés
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADP	: adénosine diphosphate
AIF	: apoptosis inducing factor
ATM	: ataxia telangiectasia mutated
ATP	: adénosine triphosphate
ATR	: ataxia telangiectasia related
bFGF	: basic fibroblast growth factor
BH	: homologie de séquence Bcl-2
BIR	: baculovirus IAP repeat
CAD	: caspase activated DNase
CARD	: caspase activation recruitment domain
CE	: cellule endothéliale
CML	: cellules vasculaires musculaires lisses
CS	: 4-sulfate de chondroïtine
DD	: death domain
DED	: death effector domain
DNA-PK	: DNA protein kinase
EGF	: epidermal growth factor
endoG	: endonucléase G
ERK	: extracellular regulated kinase

FADD	: Fas associated death domain
FAK	: focal adhesion kinase
FasL	: Fas ligand
FGF	: fibroblast growth factor
FPLC	: fast protein liquid chromatography
GAG	: glycosaminoglycan
GM-CSF	: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HS	: sulphate d'héparane
HUVEC	: human umbilical vein endothelial cell
IAP	: inhibitor of apoptosis protein
ICAD	: inhibitor of CAD
ICAM	: molécule d'adhésion intercellulaire
kD	: kiloDaltons
LDL	: low density lipoprotein
LG	: laminin type G domain
MAPK	: mitogen activated protein kinase
MB	: membrane basale
MCP	: mort cellulaire programmée
MEC	: matrice extracellulaire
MMP	: matrix metalloproteinase
MT	: microangiopathie thrombotique
NO	: oxyde nitreux
PDGF	: platelet derived growth factor
PI3K	: phospatidylinositol-3 kinase

PKB : protein kinase B

PKC : protein kinase C

siRNA : short interfering RNA

SSc : sclérose systémique

SSC : milieu sans sérum conditionné par des CE apoptotiques

TGF- $\beta$ 1 : transforming growth factor beta-1

TNF- $\alpha$  : tumour necrosis factor alpha

UV : ultra-violet

VCAM : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

## 1. INTRODUCTION

## *1.1. Mort Cellulaire Programmée*

### *1.1.1. Aperçu*

Il est aujourd'hui bien connu que la mort cellulaire programmée (MCP) est un phénomène de suicide cellulaire essentiel au développement, au maintien et à l'intégrité des organismes multicellulaires, ce qui assure l'homéostasie de l'être vivant (1-4). En effet, la MCP permet d'assurer un équilibre entre les composantes cellulaires d'un tissu/organe en répondant, avec l'aide d'une machinerie moléculaire sophistiquée, à divers stimuli physiologiques, pathogéniques ou cytotoxiques (5). De ce fait, un désordre au niveau des mécanismes contrôlant le suicide cellulaire joue un rôle important dans la pathogénèse d'un grand nombre de maladies (2, 4). À ce jour, plusieurs recherches ont été effectuées de façon à mieux comprendre la régulation moléculaire de ce suicide cellulaire, mais elles en ont aussi démontré la complexité du fait qu'il existe différentes voies parallèles d'auto-destruction dans une même cellule (2). De plus, les effecteurs qui composent ces voies peuvent avoir des actions indépendantes à la mort cellulaire programmée, voire même des actions opposées comme sur la prolifération cellulaire (2). Par ailleurs, le destin de chaque cellule est soumis aux types d'interactions qu'elle entretient avec les autres cellules de l'organisme, laissant ainsi entrevoir l'existence d'un contrôle social. En fait, l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire permet une régulation du nombre de cellules et un ajustement constant des différents types cellulaires qui composent nos tissus/organes (6). Ce qui fait de la MCP un processus complexe, régulée génétiquement, permettant aux êtres vivants multicellulaires une adaptation efficace aux divers changements environnementaux. Il existe plusieurs

types de mort cellulaire programmée (3, 7) dont la principale forme est dite apoptotique, soit l'apoptose.

### 1.1.2. Apoptose

L'apoptose est la forme la plus caractérisée des MCP et est considérée comme une mort cellulaire silencieuse permettant un retrait des cellules non désirées sans initier de réaction inflammatoire, limitant ainsi les dommages à l'environnement local (4, 8). Son exécution est caractérisée par des changements morphologiques et biochimiques qui ont été observés pour la première fois par Kerr *et al.* en 1972 où la cellule est décrite pour mourir et disparaître en 3 étapes bien définies : l'engagement, l'exécution et l'élimination de la cellule (9). Durant l'apoptose, on observe : condensation du noyau, du cytoplasme et de la chromatine (10), fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (4, 11), formation de protubérances au niveau de la membrane plasmique menant à la formation de corps apoptotique et ce, tout en conservant l'intégrité membranaire (4, 9). Ceux-ci peuvent alors être rapidement reconnus, phagocytés et digérés par les macrophages ou cellules avoisinantes grâce à l'externalisation des phosphatidylsérines au niveau de la membrane plasmique de la cellule apoptotique, le tout sans réaction inflammatoire (10, 12). L'apoptose est normalement associée à l'activation d'endonucléases qui dégradent l'ADN chromosomique en fragments nucléosomales de 50 à 300 kilobases et subséquemment en plus petits fragments d'environ 180 paires de bases (13, 14). Ces nucléases responsables de la fragmentation en échelle de l'ADN sont elles-mêmes activées par des protéases activées spécialement dans les cellules apoptotiques : les caspases. Celles-ci sont



responsables de plusieurs changements morphologiques au niveau de la cellule. Leur activation est cependant soumise à la signalisation hautement régulée des programmes apoptotiques de la cellule pouvant découler principalement de deux voies : la voie intrinsèque (ou mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou récepteur de mort) (15-17).

#### 1.1.2.1. Les caspases

Les caspases (Cysteine *AS*Partyl-specific Prote*ASES*) ont un rôle clé dans l'exécution cellulaire (18, 19). Elles ont été hautement conservées au cours de l'évolution et peuvent être retrouvées tout aussi bien chez l'humain, la souris ou le nématode *C.Elegans* (18, 20). Les caspases jouent un rôle bien actif dans la mort cellulaire, mais elles nécessitent un clivage protéolytique pour être activées. Cette activation est souvent dépendante de l'activité protéolytique intrinsèque des molécules zymogènes (pro-caspases) et ce pour des concentrations permettant une auto-activation (21, 22). Les caspases sont donc constituées d'un pro-domaine de longueur variable en N-terminal suivi d'une sous-unité p20 et d'une sous-unité p10, ces deux dernières étant essentielles à la formation d'un hétérotétramère actif (19, 23, 24). Les caspases errent dans la cellule sous forme de zymogènes inactifs et sont activées par protéolyse au site spécifique Asp-X (21). La spécificité de la caspase est déterminée par les quatre acides aminés placés en N-terminal du site de clivage (25). La cascade protéolytique menant à la mort cellulaire est caractérisée par l'activation des caspases initiatrices extrinsèques et intrinsèques (respectivement la caspases-8 et la caspase-9) menant à l'activation de caspases effectrices (caspase-3,-6,-7). Jusqu'à ce jour, plus d'une douzaine de caspases ont

été identifiées chez les mammifères dont les deux tiers semblent avoir une fonction dans l'apoptose (18, 19), mais les interactions entre celles-ci sont loin d'être complètement définies.

Les caspases effectrices disposent de plusieurs substrats ayant, une fois spécifiquement reconnus et clivés, diverses influences sur le devenir de la cellule apoptotique (1). Entre autres, on retrouve l'endonucléase responsable de la fragmentation en échelle de l'ADN, la « Caspase-Activated DNase » (CAD). L'activation de CAD est dépendante du clivage de sa sous-unité inhibitrice ICAD (26) par la caspase-3 permettant ainsi la libération de la sous-unité catalytique (27-29). Par ailleurs, le clivage des lamines nucléaires par les caspases entraînent une réduction et un bourgeonnement du noyau (30, 31). Le clivage de fodrine et de gelsoline, deux protéines du cytosquelette, sont impliquées dans l'externalisation des phosphatidylsérines et la condensation nucléaire (32) tandis que le clivage de PAK2, un membre de la famille des p21-kinases, engendre les protubérances membranaires observées au niveau des cellules apoptotiques (33). Bien que centrale à l'exécution de l'apoptose, l'activation des caspases est hautement régulée que ce soit au niveau des voies intrinsèques ou extrinsèques par les protéines qui composent ces voies : les une favorisant l'apoptose et les autres favorisant la survie de la cellule. Plusieurs de ces protéines sont regroupées sous la famille des Bcl-2.

#### 1.1.2.2 La famille Bcl-2

La famille des gènes « B-cell lymphoma » (Bcl) (34) regroupe plus de 20 membres (4) codant pour diverses protéines qui sont regroupées en trois groupes fonctionnels : anti-apoptotique, pro-apoptotique à multidomaines et pro-apoptotique BH3-seul (35, 36). Les membres du groupe I de la famille des Bcl-2 comme Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl1 possèdent une activité anti-apoptotique et sont caractérisés par un alignement de quatre domaines conservés ayant des homologies de séquences Bcl-2 (BH), soient BH1 à BH4 (1). On les retrouve ancrés par leur queue C-terminale riche en acides aminés hydrophobes au niveau de la surface externe de la mitochondrie (4), occasionnellement au niveau du réticulum endoplasmique (1, 37) et de l'enveloppe nucléaire (37). D'autres membres anti-apoptotiques du groupe I comme A1/Bfl-1 ne possèdent pas le domaine transmembranaire et se retrouvent dans le cytosol (4). Pour en revenir à Bcl-Xl plus spécifiquement, elle est une des protéines anti-apoptotiques les plus caractérisées. Son rôle dans l'inhibition d'une grande variété de stimuli apoptotiques, dont la bléomycine et l'étoposide, est bien connu (38, 39). Des études de délétion génique (« knockout ») réalisées chez la souris ont montré que la protéine Bcl-Xl est essentielle aux processus anti-apoptotique permettant le bon développement des organes lors de l'embryogénèse (40). Bien qu'étant exprimée dans plusieurs types de cellule, on retrouve une bonne concentration de protéines Bcl-Xl au niveau de l'épiderme où elle semble y jouer un rôle dans la protection de la peau contre l'apoptose induite par les rayons UV (Ultra-Violet) (41). Aussi, Raina *et al.* ont récemment montré que l'expression de Bcl-Xl, sous contrôle de la voie PI3K/Akt, est en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique chez des fibroblastes (42). Le rôle intrinsèque de Bcl-Xl dans les processus apoptotiques

s'établit à la mitochondrie où elle contrôle la stabilité de la membrane mitochondriale de façon à bloquer la sortie du cytochrome c et les mécanismes qui en découlent (43, 44). Bcl-Xl a aussi été répertoriée comme étant capable de bloquer l'activité de la caspase-3 et subséquemment la dégradation des lamines nucléaires (45, 46). Les membres du groupe II de la famille des Bcl-2 comme Bax et Bak possèdent une activité pro-apoptotique, une ou pas de queue hydrophobe permettant l'insertion membranaire en plus de contenir tous les domaines d'homologie Bcl-2 (BH) à l'exception de BH4 (35, 36). Bax, tout comme Bcl-Xl, est un important régulateur des processus apoptotiques dans plusieurs systèmes cellulaires. Les dommages irréparables subis au niveau de l'ADN, ce dont il sera question dans la prochaine section, entraînent couramment l'activation de p53. Lorsque phosphorylée, p53 migre au noyau et engendre une augmentation de la transcription de la protéine pro-apoptotique Bax (47, 48). Celle-ci sera alors en mesure de se diriger à la mitochondrie pour favoriser la sortie du cytochrome c et l'induction de l'apoptose. Par ailleurs, la protéine p53 possède aussi une activité pro-apoptotique indépendante à la transcription génique du fait qu'elle peut agir au niveau cytoplasmique en séquestrant Bcl-Xl et en activant Bax. De leur côté, les membres du groupe III de la famille Bcl-2 ou BH3-seul ont comme particularité, en plus de leur activité pro-apoptotique, d'avoir le BH3 comme unique domaine d'homologie à Bcl-2 (36). Bad, Bim et Bid font partie de ce troisième groupe (4). Pour ce qui est de la protéine Bim, elle joue un rôle important lors de l'embryogénèse et lors des processus de défense contre les réactions auto-immunes, contribuant ainsi à l'homéostasie de l'être vivant (49). En plus d'être soumise au contrôle transcriptionnel, Bim est aussi régulée au niveau post-

traductionnel de par une séquestration de la protéine au niveau du cytosquelette et ce, chez plusieurs types de cellules mammifères (49). En fait, la chaîne légère de la dynéine (LC8) peut interagir avec la région N-terminale de certains isoformes Bim (L et EL) de façon à inhiber leur propriété pro-apoptotique (50). Sous stress apoptotique, Bim peut être libérée dans la cellule où elle ira inactiver les membres anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. D'une façon plus générale, l'ensemble des protéines de la famille des Bcl-2 est intimement relié à la régulation de la sortie du cytochrome c à partir de la mitochondrie.

En effet, les membres de la famille Bcl-2, bien que régulés par des interactions protéine-protéine, sont principalement des régulateurs de l'apoptose via la voie mitochondriale. En ce qui concerne les interactions protéine-protéine, il peut y avoir homodimérisation de protéines de la même sous-famille ou hétérodimérisation entre familles pro et anti-apoptotiques annulant l'un et l'autre leur effet intrinsèque respectif (35, 36, 51). Le devenir de la cellule se résume donc aux proportions relatives de protéines pro et anti-apoptotiques retrouvées dans la cellule : un excès de protéines pro-apoptotiques sensibilisera la cellule à l'apoptose tandis qu'un excès de protéines anti-apoptotiques favorisera la survie de la cellule (1).

#### 1.1.2.3. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou mitochondriale est activée suite à un stress génotoxique qui endommage l'ADN et se caractérise par l'activation de la pro-caspase 9, la caspase initiatrice de cette voie (16, 17). Les bris double brin de l'ADN sont

perçus par des enzymes de la famille Phosphatidylinositol 3-OH-kinase (ATM, ATR et DNA-PK) qui, à leur tour, activent d'autres kinases (Chk1 et Chk2) placées en aval dans la cascade de signalisation, le tout ayant la propriété de phosphoryler un résidu sérine à l'extrémité N-terminale de p53, une importante protéine pro-apoptotique suppresseur de tumeurs (52). Ceci a pour effet d'augmenter la fonction de transactivation de p53 et/ou d'inhiber l'interaction de p53 avec MDM2 prévenant ainsi la dégradation de p53 (47, 48). Il est bien connu que p53 influence la transcription de certains membres de la famille Bcl-2 dont Bcl-2 lui-même de par une diminution de son expression et Bax de par une augmentation de son expression, soit deux phénomènes favorisant la mort cellulaire (47, 48). La carence en sérum peut aussi activer la voie intrinsèque par une stabilisation de p53 (53, 54).

La suite des événements converge vers la mitochondrie, souvent par des protéines pro-apoptotiques, où il est possible d'observer une lutte entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ce qui affectera la perméabilisation membranaire de la mitochondrie (36, 51). Advenant une concentration plus grande de protéines pro-apoptotiques à la surface de la mitochondrie, il y aura relâche de certaines protéines à partir de l'espace mitochondriale intermembranaire tel que le cytochrome c par des mécanismes encore aujourd'hui grandement débattus (1, 55). Il est à noter que le cytochrome c n'est pas le seul facteur pro-apoptotique libéré par la mitochondrie. Des molécules de type Smac/DIABLO sont aussi relâchées dans le cytosol suite à un stimulus apoptotique (56-58). L'extrémité N-terminale de ces protéines leur permet de lier

et d'inhiber les protéines inhibitrices de l'apoptose : les IAPs (« Inhibitor of Apoptosis Proteins ») de par une liaison à leurs domaines BIR (« Baculovirus IAP Repeat ») (59) normalement utilisés par les IAPs pour s'associer aux diverses caspases de façon à les inhiber (60). L'apoptose survient donc généralement lorsque les niveaux de Smac/DIABLO sont suffisamment élevés de façon à séquestrer les IAPs et permettre subséquemment l'activation des caspases. La mitochondrie, sous stress apoptotique, peut aussi relâcher dans le cytosol une flavoprotéine AIF (« Apoptosis Inducing Factor ») qui possède une activité apoptotique méconnue (61), mais qui semblerait faire partie d'un programme de mort cellulaire programmée caspase indépendant (62). En fait, AIF peut migrer de la mitochondrie au noyau causant par la suite une condensation de la chromatine et une fragmentation à grande échelle de l'ADN nucléaire (57). Par ailleurs, une nucléase connue sous le nom d'Endo G (endonucléase G) (56) et quelques molécules de caspases, dont les pro-caspases 2,3 et 9 (63), peuvent aussi être libérées de l'espace intermembranaire de la mitochondrie soumise à un stress apoptotique. Une fois relâchée dans le cytosol, l'EndoG, qui possède une activité indépendante à l'activation des caspases, est en mesure d'induire une fragmentation de l'ADN nucléosomale (28, 29, 56, 64).

En ce qui concerne l'activation de la caspase-9, elle nécessite l'apport d'un complexe macromoléculaire formé suite au stimulus apoptotique et composé du cytochrome c, d'Apaf-1, de procaspases-9 et d'ATP/dATP (Adénosine TriPhosphate), ce qui forme l'apoptosome (65-67). Ce complexe protéique permet ensuite l'activation de la caspase-3 effectrice qui enclenchera une cascade

d'activation des caspases-2-6-7 et -10 permettant ainsi les changements morphologiques et biochimiques caractéristiques à l'apoptose comme, par exemple, le clivage des lamines nucléaires qui engendre la condensation et le bourgeonnement nucléaire (30, 31). Apaf-1 est une protéine d'échafaudage homologue à Ced-4 chez *C.Elegans* (68) qui possèdent des domaines CARD (« Caspase Activation Recruitment Domain ») en N-terminal leur permettant d'interagir avec les domaines CARD des caspases pour faciliter leur activation (68). En effet, dans le cas où la concentration en zymogènes n'est pas suffisante pour permettre l'activité auto-catalytique, l'activation des caspases nécessite ce type de protéines d'échafaudage telle que Apaf-1 (69, 70). D'autres homologues à Ced-4 ont aussi été retrouvés chez les mammifères comme Nod1 et Nod2 (71, 72) et Ipaf (73).

L'activation de la voie apoptotique intrinsèque par une cellule en désir de mourir peut être fortement influencée par les membres pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 qui peuvent, quant à eux, être régulés par la voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt (74).

#### 1.1.2.4. Voie extrinsèque

Des signaux pro-apoptotiques extracellulaires peuvent aussi être captés par la cellule initiant ainsi un processus de mort cellulaire programmée récepteur dépendant ou plus communément appelé voie apoptotique extrinsèque (75). Cette voie de signalisation menant à l'apoptose est initiée par la liaison d'un ligand à son récepteur spécifique de mort cellulaire comme, par exemple, l'interaction



Fas/FasL. Cette liaison permet ensuite l'initiation de la cascade d'activation des caspases via la caspase initiatrice de cette voie, c'est-à-dire la caspase-8 et ce, dans certains cas, sans l'apport de la mitochondrie (76). En fait, la liaison du ligand à son récepteur, qui possède un domaine DD (« Death Domain »), engendre la formation d'un complexe de signalisation de mort cellulaire (1). Celui-ci permet ensuite le recrutement de protéines adaptatrices possédant des domaines DD et DED (« Death Effector Domain ») comme, par exemple, FADD (« Fas Associated Death Domain protein ») (1). Cette dernière est en mesure de recruter des molécules de procaspase-8 via leur domaine DED et d'en favoriser l'accumulation de façon à promouvoir, selon le modèle d'induction des caspases par proximité, leur auto-activation grâce à leur activité de clivage intrinsèque (77). S'en suivra ensuite l'activation de la caspase-3 effectrice, soit un point de convergence entre la voie apoptotique intrinsèque et extrinsèque, qui activera la cascade des caspases et subséquemment le clivage des substrats propres aux différentes caspases. Il y aura ensuite apparition des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose (78). Il existe aussi un autre point de convergence entre les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques utilisé par la cellule pour amplifier un signal apoptotique extracellulaire avec l'aide de la mitochondrie (79). En effet, la protéine Bid, un membre pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 (75) peut être clivée par la caspase-8 pour générer tBid (Bid tronquée) qui pourra alors migrer du cytosol à la mitochondrie où elle ira s'insérer (57, 80). Il y aura alors compétition à la surface de la mitochondrie avec les autres membres de la famille des Bcl-2 où tBid agira comme facteur pro-apoptotique favorisant la sortie du

cytochrome c (81). Un schéma global des voies apoptotiques est présenté à la figure 1.

### 1.1.3. Autres types de mort cellulaire programmée

Certaines cellules ont l'habileté exceptionnelle de survivre malgré l'activation de caspases pro-apoptotiques démontrant ainsi la flexibilité des programmes de mort cellulaire (82-86). Ces événements, qui font l'objet de plus en plus de projets de recherche, supportent aussi l'idée que la simple activation des caspases n'est pas suffisante à l'induction de la mort cellulaire programmée dite apoptotique (3). Nous retrouvons, par contre, d'autres types de mort cellulaire programmée dite non-apoptotiques, comme l'apoptose-apparentée et la nécrose-apparentée, qui peuvent posséder quelques caractéristiques de l'apoptose classique. Dans un premier temps, l'apoptose-apparentée se caractérise par une légère condensation de la chromatine en plus d'extérioriser les marqueurs de phagocytose avant la formation des corps apoptotiques, ce que ne fait pas la cellule apoptotique normale (3). De plus, plusieurs modèles de mort cellulaire apoptose-apparentée n'utilisant pas l'activation des caspases pour parvenir à leur fin se retrouvent dans cette catégorie (82, 87). À cet effet, certaines analyses ont révélé des boursouflures au niveau de la membrane plasmique de cellules mourantes où il n'y avait pas d'activité caspase (82, 88). Dans un deuxième temps, la nécrose-apparentée est caractérisée principalement par l'absence de condensation de la chromatine et l'utilisation de caspases indépendantes aux programmes apoptotiques normaux (ex. :caspases-1-11-12-14) (23). L'activation de la caspase-8 a cependant déjà été

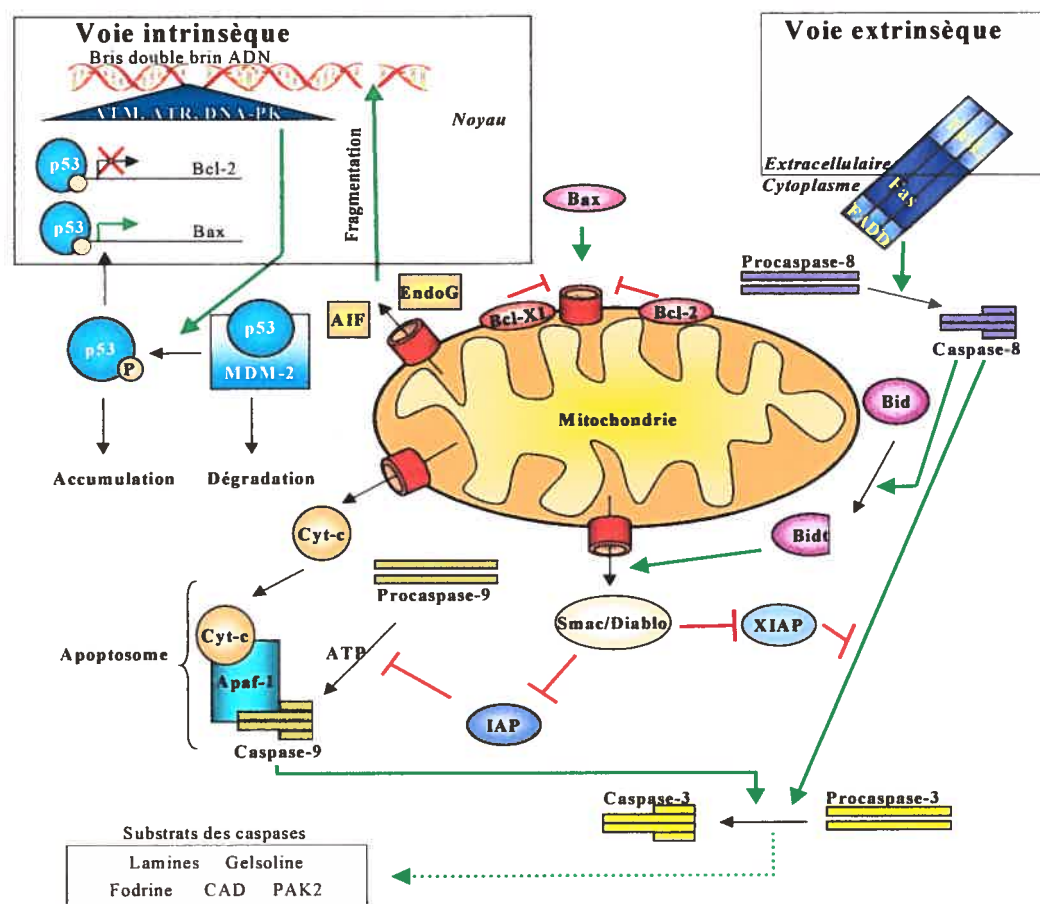


Figure 1. Schéma global des voies apoptotiques. Du côté de la voie intrinsèque, le bris de l'ADN est perçu par des kinases spécifiques (ATM/ATR et DNA-PK) qui favoriseront l'activation de p53. Ceci aura pour effet de favoriser l'expression de Bax et l'inhibition de l'expression de Bcl-2. S'en suivra une perméabilisation de la membrane mitochondriale, une sortie du cytochrome c en plus des protéines Smac/DIABLO, AIF et EndoG. Le cytochrome c sera en mesure de former

l'apoptosome avec Apaf-1, caspase-9 et de l'ATP, ce qui mènera à l'activation de la caspase effectrice-3 et subséquemment à la cascade de caspases menant à l'activation de leurs substrats spécifiques. Du côté de la voie extrinsèque, la liaison d'un ligand pro-apoptotique à son récepteur de mort cellulaire spécifique (ex.: FasL/Fas) favorisera le recrutement et l'activation des procaspases-8 selon le modèle d'autoactivation par proximité. Cette caspase a à la fois la propriété d'activer directement la caspase effectrice-3 ou de tronquer (et donc activer) la protéine pro-apoptotique Bid qui viendra favoriser la perméabilisation mitochondriale. La relâche des facteurs à partir de la mitochondrie est dépendante de la présence des membres de la famille Bcl-2 à la surface membranaire où une concentration supérieure en membres pro-apoptotiques favorisera l'apoptose. Quant à l'activation des caspases, elle peut être influencée par les IAPs qui, de leur côté, sont régulées par les protéines de type Smac/DIABLO. Les IAPs peuvent à la fois bloquer la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase effectrice-3.

observée dans ce type de MCP (89). On retrouve aussi, comme MCP, un sous-groupe de mécanismes classé comme « apoptose interrompue » où le programme apoptotique standard est mis en route, interrompu au niveau des caspases et finalement terminé par des voies alternatives caspases indépendantes (90).

D'autres protéines ont aussi été identifiées comme étant capable d'induire une MCP non-apoptotique : les cathepsines et ce, avec ou sans l'apport des caspases (91). Cependant ces protéases ont aussi été impliquées dans l'induction de l'apoptose (92). Les cathepsines sont normalement confinées dans les lysosomes où elles ont des fonctions de dégradation, mais sont capables d'induire, suite à une sortie dans le cytosol, des changements pro-apoptotiques au niveau de la mitochondrie (91). Les cathepsines D (93), B (94, 95) et L (96) ont été répertoriées comme facteurs impliqués dans les processus de mort cellulaire, ayant des impacts sur le clivage de la protéine Bid et sur la perméabilisation de la mitochondrie et donc sur la sortie du cytochrome c. Par ailleurs, tel que mentionné plus haut, AIF et EndoG peuvent aussi être considérées comme des protéines induisant une MCP non-apoptotique.

#### 1.1.4. Nécrose

La nécrose n'est pas considérée comme un processus de MCP puisqu'en fait, elle est un type de mort accidentelle non régulé qui ne peut être arrêtée que par le retrait du stimulus de départ (3). La nécrose se caractérise par un gonflement du noyau, des organelles et du volume cellulaire (30 à 50% d'augmentation) (97) accompagnée d'une perte de la perméabilité membranaire ce qui mènera à la lyse

de la paroi cellulaire (3, 98). Ceci peut être causé suite à l'exposition des cellules à de grandes concentrations de détergents, d'oxydants, d'ionophores ou tout simplement suite à une insulte pathologique de forte intensité (arrêts/attaques cardiaques) (99); le tout ayant pour effet le déversement du contenu intracellulaire dans l'environnement local entraînant du même coup une réponse inflammatoire (90).

#### 1.1.5. Désordres de la mort cellulaire

La nécrose est une mort accidentelle et pro-inflammatoire souvent retrouvée suite à un stimulus physique de forte intensité. Puisque la nécrose représente une mort cellulaire non régulée, il est difficile d'y associer des désordres physiologiques qui viendraient compromettre son comportement déjà irrégulier. À l'opposé, la MCP apoptotique est régulée et impliquée dans la plupart des processus de mort cellulaire physiologique. L'apoptose joue un rôle important, surtout au cours du développement foetal et adulte, dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire. Cependant, des désordres dans les mécanismes de l'apoptose contribuent au développement de plusieurs maladies, incluant celles où l'on retrouve un excès de cellules (cancer, sclérose systémique) ou un manque de cellules (infarctus du myocarde ou maladies neurodégénératives : Alzheimer, Parkinson, Huntington) (4, 100). Il devient donc important de bien comprendre les mécanismes régulant l'apoptose de façon à développer des agents thérapeutiques qui pourront stimuler ou inhiber les processus apoptotiques et subséquemment favoriser le rétablissement des désordres reliés à la mort cellulaire.

## *1.2 Insulte Vasculaire, Réparation et Fibrose*

### *1.2.1. Aperçu*

La mort des cellules de la paroi vasculaire comme les cellules endothéliales (CE), les cellules musculaires lisses (CML) et les fibroblastes est un phénomène important dans la pathogénie de nombreuses maladies, dont les plus courues sont celles d'ordre cardio-vasculaire (101). Parmi les structures vasculaires, l'endothélium, qui est composé principalement de cellules endothéliales, est le plus exposé à des agressions de toutes natures et représente souvent le point de départ des phénomènes de réparation (101, 102). Ainsi, les mécanismes de réponse à l'insulte initialement activés au niveau de l'endothélium se propagent souvent, selon l'intensité ou le type d'insulte, vers les autres couches de la paroi vasculaire (103). Les mécanismes de réparation alors activés de part et d'autre de la paroi se résument ainsi : dysfonction de l'endothélium, infiltration de cellules inflammatoires, prolifération cellulaire locale (CML et fibroblastes), différenciation de fibroblastes en myofibroblastes, sécrétion d'éléments de la matrice extracellulaire (MEC) et finalement l'apoptose des cellules excédentaires (104-109). Ces processus sont donc mis en marche de façon à favoriser un remodelage positif (sans fibrose) de la paroi vasculaire ce qui permettra ultimement de retrouver un endothélium structuré et fonctionnel (110). Plusieurs pathologies comme l'athérosclérose et la sclérose systémique sont caractérisées par un remodelage négatif de la paroi vasculaire ou des cellules spécialisées sont responsables de l'épaississement et de la dysfonction du tissu en réparation (103, 111). Un de ces types cellulaires spécialisés est le myofibroblaste, un type cellulaire normalement transitoire aux processus de réparation, mais qui peut aussi

être responsable d'une sécrétion excessive de MEC l'impliquant ainsi dans la formation néointimale, le remodelage vasculaire pathologique et la fibrose (112-116). Les lésions ou dysfonctions au niveau de l'endothélium peuvent donc déstabiliser la structure organisée de la paroi vasculaire et être source d'une réponse inflammatoire non désirée (103).

#### 1.2.1.1. Apoptose des cellules endothéliales

Les désordres vasculaires résultant d'une dysfonction des cellules endothéliales peuvent être causés par une grande variété de stimuli incluant les pathogènes infectieux, les agents cytotoxiques et les mécanismes pathophysiologiques médiés par une réponse immunitaire (117). La dysfonction des cellules endothéliales se caractérise, entre autres, par l'activation de l'apoptose et d'une réaction auto-immune anormale (117). Plus précisément, le comportement des cellules endothéliales s'en trouve affecté et a pour conséquences d'augmenter leur propriété adhésive et leur perméabilité membranaire, d'induire la production de facteurs procoagulants, de molécules vasoactives, de cytokines et de facteurs de croissance, le tout ayant influence sur l'environnement local (118). En situation normale, les cellules endothéliales peuvent, selon les conditions de l'environnement, générer des molécules effectrices qui inhibent la thrombose, l'inflammation, la tonification vasculaire et le remodelage vasculaire (119). Un bon exemple de maladie liée à une dysfonction endothéliale pathologique est l'athérosclérose, caractérisée par le développement d'une réponse inflammatoire progressive suite à l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères moyennes et larges (119). Il existe plusieurs facteurs de risque répertoriés pour



l'athérosclérose comme l'hyperglycémie, les LDL (« Low Density Lipoprotein ») oxydées et l'hypertension qui ont la caractéristique commune d'induire l'apoptose des cellules endothéliales (119-121). Par ailleurs, il existe d'autres facteurs qui ont la propriété d'induire l'apoptose des cellules endothéliales dont l'oxyde nitreux (NO) (122), les auto-anticorps (123) et les facteurs de risque reliés à la transplantation d'organes, qu'ils soient d'ordre aigu ou chronique (101).

#### 1.2.1.1.1. NO

L'oxyde nitreux (NO) est une molécule endogène ayant des propriétés vasodilatatoires, anti-athérogéniques et se retrouve donc impliquée dans des mécanismes modulant les fonctions de la paroi vasculaire (119, 124). À des concentrations nanomolaires, donc sous les niveaux basaux, NO protège les cellules endothéliales contre les stimuli apoptotiques tels que le TNF- $\alpha$  (« Tumor Necrosis factor- $\alpha$  »), la carence en sérum et l'hypoxie (124). Au contraire, à des concentrations de NO de l'ordre du micromolaire, concentration retrouvée durant les processus inflammatoires, les cellules endothéliales deviennent apoptotiques (124-126). L'importance de l'apoptose endothéliale induite par le NO est aujourd'hui reconnue cliniquement comme facteur important dans les dysfonctions endothéliales contribuant à l'athérosclérose et aux pathologies associées à la transplantation vasculaire (127-130). Les études réalisées sur les mécanismes d'induction de l'apoptose par le NO ont révélé une participation importante de la mitochondrie chez les cellules endothéliales (122). Une exposition prolongée des CE à de hautes concentrations de NO inhibe la respiration mitochondriale en inhibant la cytochrome oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire

mitochondriale) résultant en une augmentation de la perméabilité membranaire et une sortie du cytochrome c dans le cytosol. S'en suivra la cascade de caspases initiée par la caspase-9 suite à la formation de l'apoptosome et menant aux changements morphologiques et biochimiques caractéristiques à l'apoptose (122).

#### 1.2.1.1.2. Facteurs de risque pour la transplantation

Lors de greffes d'organes, les cellules endothéliales de la paroi vasculaire représentent la première cible de la réponse humorale et cellulaire en raison de leur position stratégique à l'interface entre le tissu greffé et le sang du receveur (131). En plus de l'ischémie froide et de l'âge qui représentent des facteurs contribuant à l'apoptose des cellules endothéliales lors de transplantations, les anticorps circulant et les effets cytotoxiques des cellules immunitaires du receveur sont causes de perturbations vasculaires au niveau de l'endothélium du greffon (131). Dans certains cas de rejet (principalement chronique), la cellule endothéliale est détruite, en présence du système du complément, par des anticorps anti-cellules endothéliales causant ainsi une dysfonction de l'endothélium et de la paroi vasculaire (101). Les dysfonctions endothéliales sont ensuite entretenues et progressivement aggravées par l'accumulation locale de macrophages et de lymphocytes T cytotoxiques (101). Dans le cas d'une dysfonction endothéliale chronique, le rejet peut être caractérisé par une accumulation excessive de CML dans la vascularisation entraînant ainsi une dysfonction progressive de l'organe greffé (132, 133).

#### 1.2.1.1.3. Anticorps anti-cellules endothéliales

Ces dysfonctions de l'endothélium sont dues, en partie, à l'activation anormale du système immunitaire où des anticorps anti-cellules endothéliales (AACE) sont produits par l'organisme causant ainsi de graves maladies auto-immunes comme la sclérose systémique (SSc) (117, 123). Bordon *et al.* ont ainsi démontré, *in vitro*, que les AACE, présents chez les patients atteints de SSc, représentent l'un des facteurs responsables de l'externalisation des résidus phosphatidylsérines au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales, soit une caractéristique de l'apoptose (123). Ceci a aussi été démontré *in vivo* par Worda *et al.* (134). Par ailleurs, Lin *et al.* ont démontré dernièrement que la présence de AACE peut induire, via un mécanisme mitochondrial NO dépendant, l'apoptose des cellules endothéliales (117). Le stimulus de départ induisant cette production d'auto-anticorps est encore aujourd'hui méconnu, mais certaines études laissent croire que certains anticorps conçus pour répondre à une infection virale pourraient réagir en croisé avec des antigènes natifs (135).

#### 1.2.1.2. Réparation vs Fibrose

L'établissement de la fibrose suite à l'apoptose des CE demeure, encore aujourd'hui, une problématique de recherche répandue. Cependant, plusieurs hypothèses tendent à dire que l'excès ou la chronicité de l'insulte au niveau de l'endothélium résulte en une inflammation excessive de la paroi vasculaire dont l'une des principales caractéristiques est le développement d'une réponse fibroproliférative chez les CML et fibroblastes avoisinants (103, 136). Dans un cadre de réparation normale, que ce soit au niveau vasculaire, pulmonaire ou dermique, les mécanismes de guérisons activés par l'organisme mènent à la

guérison du tissu endommagé et ce, sans conséquence néfaste. C'est-à-dire : il y a insulte au niveau de l'endothélium/épithélium, formation d'un tissu de réparation, prolifération cellulaire et différenciation myofibroblastique, production de protéines de la MEC et disparition des fibroblastes et myofibroblastes par apoptose suite à la cicatrisation (103, 112, 113, 136). Cependant, il existe des situations pathologiques comme la fibrose pulmonaire, rénale et la sclérose systémique où une différenciation persistante de fibroblastes en myofibroblastes et un manque d'apoptose durant la phase finale de réparation contribuent à la déformation et à la dysfonction du tissu initialement endommagé (137). En effet, la présence de ces types cellulaires contribue à une production excessive d'éléments de la MEC, majoritairement du collagène, et peut se perpétuer sur plusieurs années (137). La ligne est donc mince entre un processus de réparation bénéfique ou néfaste induit suite à un dommage à l'endothélium. Encore une fois, la chronicité de l'insulte au niveau des cellules endothéliales est l'une des hypothèses les plus en vogue quant aux mécanismes initiant la fibrose.

#### 1.2.2. Pathologies reliées à une dysfonction de l'endothélium

Les dysfonctions de l'endothélium sont responsables de nombreuses pathologies, mais plusieurs d'entre-elles se caractérisent par le développement d'une réponse fibrotique comme on le retrouve au niveau de l'athérosclérose; maladie bien décrite dans la littérature. La réponse fibrotique ou fibrose survient en association avec l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes et par une différenciation persistante de fibroblastes en myofibroblastes (112).

Brièvement, l'athérosclérose est un processus pathologique se déroulant en plusieurs étapes suite à une dysfonction de l'endothélium induite par les facteurs de risque pour l'athérosclérose ci-haut mentionnés; tous étant reconnus pour induire l'apoptose chez les cellules endothéliales (119). Ceci a pour effet de stimuler un état pro-thrombotique et pro-adhésif favorisant respectivement l'agrégation plaquettaire à la surface de l'endothélium et la transmigration de monocytes à travers la paroi vasculaire (119, 138). La suite des événements se caractérise par une prolifération et une résistance à l'apoptose des cellules de la paroi comme les CML et les fibroblastes menant à l'épaississement du tissu vasculaire et la formation néo-intimale. S'en suivra une production d'éléments fibreux au niveau de la MEC et une accumulation de lipides extracellulaires pouvant alors former des plaques fibrotiques potentiellement dangereuses à l'occlusion des artères (119, 138, 139). En effet, la plaque athérosclérotique devenant de plus en plus grosse, suite à la chronicité de l'insulte, peut se détacher pour former des thrombus qui pourraient bloquer la circulation sanguine et causer des problèmes cardio-vasculaires, par exemple (119).

Dans une même suite d'idées, la microangiopathie thrombotique (MT), initialement introduite par Symmers en 1952, définie aussi un phénomène de réponse à l'insulte se caractérisant par une lésion endothéliale et l'épaississement de la paroi vasculaire, principalement au niveau des artérioles et des capillaires (140). L'apoptose des cellules endothéliales est ici reconnue comme un facteur central causant la MT (132, 141-145). Brièvement, l'insulte endothéliale initiale

entraîne une mort et un détachement des cellules endothéliales de la membrane basale qui, dans le cas d'un processus chronique, mènera à une accumulation de CML, de fibroblastes et de myofibroblastes favorisant ainsi une réparation pathologique à caractère fibrotique (133, 146-148). La MT est très bien caractérisée au niveau de la microvascularisation rénale où il est aussi possible d'observer initialement une augmentation de l'agrégation plaquettaire favorisant la formation de microthrombi (133, 149, 150). Des phénomènes d'anémie microangiopathique, de thrombocytopénie et de dysfonctions rénales progressives pourront alors être observés chez les individus atteints. Encore ici pour la MT, c'est la chronicité de l'insulte (ou l'exagération de la réponse à l'insulte) qui rend l'apoptose des cellules endothéliales potentiellement pathologique au sens où des mécanismes de réparation infructueux peuvent être activés.

Il existe bien d'autres pathologies reliées à une dysfonction de l'endothélium où la réponse fibrotique engendrée suite à l'insulte est aussi importante qu'en athérosclérose ou en microangiopathie thrombotique, mais où le rôle des fibroblastes est plus déterminant comme on le retrouve avec la sclérose systémique.

#### 1.2.2.1. Sclérose Systémique (SSc)

La SSc est un désordre auto-immun évoluant en plusieurs étapes et caractérisé initialement par des changements pathologiques d'ordre fibrotique au niveau de la peau et plus tardivement au niveau du système vasculaire et de divers organes tels que les poumons, le cœur et les reins (136, 151, 152). En SSc, on retrouve

premièrement des anomalies du système vasculaire au niveau des cellules endothéliales qui mènent au développement d'un phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste (152, 153). À cet effet, les perturbations vasculaires perçues au niveau des CE (surtout en ce qui attrait au tonus vasculaire) précèdent les autres changements caractéristiques à la SSc. Des médiateurs comme l'endothéline, le NO, les LDL oxydés, les facteurs vasculaires cytotoxiques (AACE), l'hypoxie et les stress physiques sont en mesure d'induire une dérégulation de l'homéostasie vasculaire au niveau des cellules endothéliales. Tous ces facteurs ont, par ailleurs, été répertoriés comme éléments déclencheurs potentiels dans la pathogénèse de la SSc (154-156). Donc, suite aux dommages à l'endothélium, il y a infiltration périvasculaire de cellules inflammatoires mononucléaires et migration des fibroblastes avoisinants. Finalement, il y a accumulation excessive de collagène et autres éléments de la MEC, favorisant ainsi la fibrose au niveau du tissu (157). À cet effet, il est connu que les fibroblastes de patients atteints de SSc produisent, en culture, davantage de collagène (type I et III) que des fibroblastes contrôles normaux (158). Plusieurs hypothèses présentes dans la littérature suggèrent aussi que les mécanismes pathogéniques présents en SSc favorisent la croissance et la survie de deux sous-populations cellulaires pro-fibrotiques : les fibroblastes et les myofibroblastes (159-161). Ces derniers, une forme de fibroblastes différenciés, sont d'ailleurs présents dans les tissus de patients atteints de SSc et sont impliqués dans la production excessive de MEC (162, 163). En fait, même si les mécanismes exacts impliqués dans la pathogénèse de la SSc sont encore méconnus, on sait qu'ils incluent des processus d'inflammation, des attaques auto-

immunes et des dommages vasculaires menant à l'activation des fibroblastes (164, 165).

Bien que le rôle important des fibroblastes soit reconnu en SSc, les mécanismes permettant à ce type de cellule de résister aux stimuli apoptotiques ne commencent qu'à être élucidés (163, 166). Récemment, Jun *et al.* ont découvert une augmentation de l'activité Akt chez des fibroblastes issus de patients atteints de SSc en comparaison avec des fibroblastes issus de patients normaux (136). Akt (aussi appelé PKB : Protein Kinase B) est un substrat de la PI3K et est un important régulateur de la prolifération, du métabolisme et de la survie de plusieurs types cellulaires (167). Cette protéine, lorsque phosphorylée et activée, a une capacité d'action pouvant agir à la fois dans le noyau au niveau de la transcription de certains gènes apoptotiques et dans le cytoplasme au niveau des cascades de signalisation protéique (136). De plus, certaines hypothèses tendent à croire que la voie de signalisation PI3K/Akt pourrait aussi être responsable de la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste (168). En ce qui attrait à la production excessive de collagène retrouvée chez les gens atteints de SSc, Asano *et al.* ont récemment démontré que la voie de signalisation PI3K/Akt est impliquée dans l'expression de collagène  $\alpha 2(I)$  chez les fibroblastes sclérodermiques (169). Toutes ces informations font donc de la voie PI3K/Akt un suspect potentiel quant à l'établissement de la fibrose suite à une insulte endothéliale chez les gens atteints de SSc.



Les anomalies du système vasculaire perçues initialement au niveau des CE qui sont responsables du déclenchement de la réponse fibrotique en SSc sont plutôt d'ordre apoptotique. Plusieurs évidences suggèrent que l'apoptose des cellules endothéliales représente le premier événement perçu en SSc (136, 151). L'augmentation de l'apoptose endothéliale a été la première anomalie microvasculaire repérée avant l'initiation des changements fibrotiques chez un modèle animal atteint de SSc (151). Par ailleurs, les AACE, reconnus pour induire l'apoptose des CE (123, 134), sont présents chez une grande majorité de gens atteints de SSc. On peut donc supposer que l'apoptose des cellules endothéliales induit une réponse paracrine pro-fibrotique sur son environnement par des mécanismes encore aujourd'hui à l'étude. On sait cependant que les interactions cellule-cellule et cellule-MEC permettant une production et une relâche de diverses cytokines sont responsables de l'acquisition du phénotype anormal chez le fibroblaste sclérodermique qui se caractérise par des activités pro-prolifératives et anti-apoptotiques. Quelques cytokines potentiellement pathogéniques dans le développement de la fibrose en SSc sont connues (TGF- $\beta$ 1, PDGF et bFGF) et certaines d'entre elles peuvent à la fois être générées par les CE et les fibroblastes en plus d'être mobilisées par ces mêmes cellules à partir de la MEC (170). Ceci met d'autant plus l'accent sur les interactions existantes entre les fibroblastes et la MEC et sur les protéines membranaires (comme les intégrines et les protéoglycans de surface) qui sont responsables de la liaison de la cellule à son environnement. On est loin de bien comprendre le développement de la SSc, mais l'apoptose endothéliale s'avère être un facteur initiateur important dans l'activation d'une réponse fibrotique. Les relations mécanistiques reliant

l'apoptose des cellules endothéliales à la fibrogénèse sont cependant toujours méconnues. Chose certaine, l'apoptose des CE n'est pas silencieuse et affecte définitivement son environnement. Entre autres, les composantes du système vasculaire.

### *1.3. Système vasculaire*

Comme nous venons de le constater, la mort des cellules de la paroi vasculaire peut être impliquée dans une multitude de pathologies qui affectent à la fois les vaisseaux sanguins du système vasculaire et à la fois les tissus qui en sont irrigués. Les vaisseaux sanguins forment un réseau de conduits qui transportent le sang loin du cœur, l'acheminent jusqu'aux tissus de l'organisme et le retournent au cœur. Les artères sont des vaisseaux élastiques qui transportent le sang du cœur aux tissus et qui ont la capacité de se ramifier en artérioles, puis en capillaires. Les capillaires, vaisseaux microscopiques, permettent l'échange de nutriments, d'oxygène et de déchets métaboliques au niveau des tissus. La structure des capillaires convient merveilleusement bien à ce rôle : leurs parois sont composées d'une seule couche de cellules endothéliales (endothélium) et d'une membrane basale et sont donc plus perméables et permissives aux échanges de substances nutritives et métaboliques. Puis, en quittant le tissu, les capillaires se regroupent en petites veines, en veinules et finalement en veine pour le retour au cœur (171).

#### *1.3.1 Composantes des vaisseaux sanguins*

La structure morphologique des artères comme des veines, de la lumière (centre creux où le sang circule) vers la périphérie, est essentiellement constituée

de trois tuniques : l'intima (ou tunique interne), la média et l'adventice (ou tunique externe) (171, 172). L'intima est composée d'un revêtement endothélial simple et repose sur une couche sous-endothéliale (membrane basale) composée de fibres de collagène, de protéoglycans, de glycosaminoglycans, en particulier des sulfates d'héparane, du glycogène, de l'élastine et de la laminine (101). La média est formée de fibres musculaires lisses entre lesquelles on observe des quantités variables d'élastine, de collagènes et de protéoglycans. Les cellules musculaires lisses (CML), principales cellules de la tunique média, sont responsables du tonus vasculaire (101). L'adventice est un tissu conjonctif riche en collagène et en fibres élastiques. Cette tunique se raccorde progressivement au tissu conjonctif entourant l'organe dans lequel chemine le vaisseau. Elle est aussi parcourue de fibroblastes, de fibres musculaires lisses et parfois de petits vaisseaux (119). De plus, des nerfs vasomoteurs forment un réseau dans l'adventice et rejoignent les fibres musculaires lisses de la média à titre d'appui au tonus vasculaire (101). Les trois couches de la paroi assurent donc l'intégrité globale des vaisseaux sanguins composant notre système vasculaire, mais chaque type cellulaire de la paroi a une fonction qui lui est propre.

#### 1.3.1.1. Endothélium

L'endothélium vasculaire est un épithélium pavimenteux simple, c'est-à-dire une monocouche de cellules endothéliales qui revêt l'ensemble du système circulatoire (173). Grâce à la jonction serrée des CE, l'endothélium est depuis longtemps considéré comme une barrière sélective et perméable permettant les échanges entre le sang et le tissu irrigué (119). Il est aussi en mesure de répondre

aux stimuli de son environnement en générant des molécules effectrices pour réguler les processus de thrombose, d'inflammation, de tonus vasculaire et de remodelage vasculaire (119). En fait, l'endothélium intervient dans la coagulation du sang, métabolise certaines hormones circulantes, constitue une barrière sélective aux protéines plasmatiques, synthétise des facteurs de croissance qui agissent sur les CML et fibroblastes sous-jacents, métabolise des lipoprotéines et transporte des substances vasoactives dans la paroi vasculaire (101). En temps normal, ces activités régulées par les cellules endothéliales assurent le bon fonctionnement de la fluidité sanguine, du tonus vasculaire et des réponses immunologiques. Cependant, un stimulus pro-inflammatoire entraîne quelques changements au niveau du comportement des CE, entre autres, l'activation de l'apoptose endothéliale. Elles expriment alors des molécules d'adhésion qui viendront favoriser un phénotype procoagulant et pro-thrombotique où l'agrégation de plaquettes et de monocytes sera favorisée comme on le retrouve en MT (174, 175). À titre d'exemple, il a été démontré que l'apoptose des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), qui par une boucle paracrine, favorise l'expression des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1) et les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) chez les cellules endothéliales environnantes (176). Dans la possibilité où le stimulus pro-apoptotique perçu au niveau de l'endothélium est prolongé ou très intense, il pourrait y avoir développement d'une réponse à l'insulte exagérée et pro-fibrotique caractéristique de plusieurs maladies vasculaires.

#### 1.3.1.2. Membrane Basale

La première fonction de la membrane basale (MB ou sous-endothélium) est d'assurer l'intégrité structurale et l'élasticité des vaisseaux sanguins (175). En plus de ce rôle, elle participe à la filtration sanguine, à l'embryogénèse, influence le métabolisme cellulaire, organise les protéines au niveau des membranes plasmiques adjacentes, induit la différenciation cellulaire et sert d'autoroutes spécifiques à la migration cellulaire (177). La MB est structurée en forme de feuillet et forme une partie hautement spécialisée de la MEC pouvant être à la fois en contact avec les cellules endothéliales et le tissu conjonctif interstitiel permettant ainsi des interactions cellule-cellule ou cellule-MEC (178). Quant à sa composition, on y retrouve différents types de protéines comme les collagènes (principalement de type IV), les laminines, les nidogènes et les protéoglycans (178, 179). Chacune de ces composantes se retrouve d'ailleurs avec des fonctions spécifiques. Par exemple, les fibres de collagène de type I sécrétées par les cellules endothéliales sont capables d'activer ou de freiner la prolifération des CE tandis que la laminine facilite leur adhésion et leur multiplication (101). D'autres molécules telles que la thrombospondine, la fibronectine et la vitronectine permettent respectivement un détachement, un support de prolifération et une fixation des cellules endothéliales (101). Les nidogènes, quant à eux, seraient impliquées dans les interactions entre les réseaux de collagène et de laminine (180).

Les protéoglycans, dans leur cas, sont le pivot des interactions existant entre les éléments cellulaires de la paroi et les éléments environnants de la MEC (181). Les protéoglycans, retrouvés en bonne quantité au niveau de la MB, représentent

l'un des groupes de molécules les plus complexes et multivalents retrouvés au niveau de tissus mammifères (182). Par exemple, le perlécan est un immense protéoglycan d'environ 480 kD, initialement impliqué dans l'embryogénèse et tardivement abondamment retrouvé au niveau de la MB où il compose la structure des parois vasculaires et autres structures extracellulaires (183). Le perlécan consiste en un long corps protéique ayant une structure complètement modulaire et substituée de plusieurs chaînes latérales de sulfate d'héparane (HS) et sulfate de chondroïtine (CS) (Figure 2) (183). Pour ce qui est du corps protéique du perlécan, il est divisé en 5 domaines (I à V) (178, 181, 184), chacun ayant été cloné pour en étudier les relations structures/fonctions. Brièvement, le domaine I a plusieurs sites d'ancrage pour les glycosaminoglycans HS et CS, tous deux ayant été associés à des interactions avec la laminine-1 et le collagène IV (185, 186). Par ailleurs, ces chaînes latérales glycosylées ont été impliquées dans la liaison et l'activation du FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) (187, 188) tandis que la liaison du PDGF (Platelet Derived Growth factor) aux glycosaminoglycans du domaine III a aussi été répertoriées au niveau des interactions impliquant le perlécan et la MEC (189). Le domaine II, quant à lui, comprend quatre régions homologues à la portion du domaine de liaison au ligand du récepteur aux LDL (178). Le domaine IV est riche en modules immunoglobuline (IgG) en plus d'être reconnu pour entretenir plusieurs interaction avec son environnement : nidogènes, complexes laminine-nidogène, fibronectine et fibuline-2 (190). Le domaine V du perlécan se retrouve en C-terminal de la protéine et entretient aussi, tout comme le domaine IV, beaucoup d'interactions avec son environnement, mais on y retrouve aussi d'autres

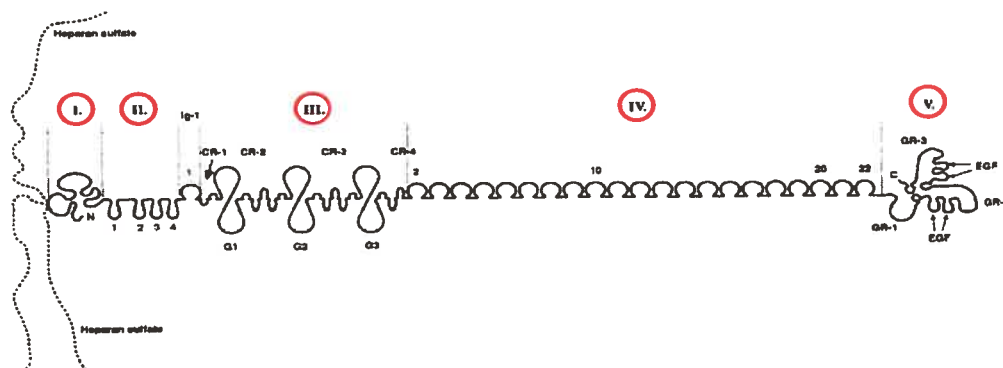


Figure 2. Représentation schématique de la structure du protéoglycan perlécan adapté de Kallunki *et al.* (178). Long corps protéique à multidomaines (I à V) globulaires substitué de chaînes latérales de sulfate d'héparane (HS) et de sulfate de chondroïtine (CS). Plus précisément, le domaine I en N-terminal comprend des sites d'ancrage pour l'HS, le domaine II comprend quatre régions homologues à la portion du domaine de liaison au ligand du récepteur aux LDL (#1 à 4), le domaine III possède trois domaines globulaires (G1 à G3) connectés par des régions riches en cystéine (CR-1 à CR-4), le domaine IV est constitué d'une répétition de 21 séquences homologues aux immunoglobulines (IgG) tandis que le domaine V en C-terminal possède trois régions homologues au domaine G de la laminine-1 (GR-1 à GR-3) séparées par quatre modules de type EGF.

domaines importants à la fonction de la protéine (191). Le domaine V consiste en une structure de 3 domaines LG (« Laminin-type G domain ») séparés par quatre modules EGF (« Epidermal Growth Factor-like module ») et portant aussi un site d'ancrage pour la CS (183).

La structure imposante et l'abondance du perlécan au niveau de la membrane basale et de la matrice extracellulaire corrélient bien avec les rôles qui lui sont associés quant à l'organisation supramoléculaire de la MB et des interactions cellule-MEC, à la relâche de diverses cytokines, au contrôle de la protéolyse extracellulaire et à la filtration macromoléculaire (192, 193). Le perlécan s'avère donc être un joueur potentiellement important dans les mécanismes de réparation induit suite à une insulte endothéliale au sens où ses capacités d'interactions avec son environnement permettront une meilleure communication intercellulaire au niveau de la paroi vasculaire.

#### 1.3.1.3. Cellules musculaires lisses

La CML, composante principale de la média, est le type cellulaire qui assure une régulation de la plasticité de la paroi vasculaire de par sa capacité à en modifier le tonus suite aux stimuli extérieurs. En effet, les CML ont la propriété de se différencier entre un phénotype de type contractile et un phénotype de type synthétique (ou passif) et vice versa (194). Cette transformation en type synthétique survient en réponse à l'insulte vasculaire et inclut une réorganisation structurale des protéines du cytosquelette en plus d'induire la disparition des myofilaments. Ceci permet aux CML de perdre leur force contractile, ce qui leur



permettront de migrer vers l'intima, proliférer et sécréter de la MEC contribuant ainsi au remodelage vasculaire et, dans des cas plus pathologiques, aux désordres myo-intimaux (194). En fait, les CML, tout comme d'autres types cellulaires actifs dans les processus de réparation, peuvent être impliquées dans des mécanismes de remodelage vasculaire pathologique où la réaction normale de réparation ne s'arrête pas. En situation normale (sans insulte vasculaire), les CML ont besoin de leur force contractile pour maintenir le tonus vasculaire au niveau des parois et ainsi assurer une circulation sanguine adéquate. Par ailleurs, lorsque l'intégrité de l'endothélium n'est pas compromise, il y a inhibition de la prolifération des CML sous-jacentes.

Malgré cette plasticité exceptionnelle, les CML sont aussi principalement impliquées dans différentes pathogénèses comme, par exemple, l'athérosclérose (195, 196). Tel que décrit plus haut, dans les premières étapes de l'athérosclérose suite à l'induction du stress endothélial, les CML migrent de la média vers l'intima où elles prolifèrent et sécrètent des éléments de la MEC contribuant ainsi à la réparation du tissu endommagé (194). Encore une fois, une dysfonction chronique de l'endothélium entraîne le développement de pathologies associées à des mécanismes de remodelage infructueux pouvant mener, dans le cas des CML, au développement d'une masse fibrotique et à l'épaississement myo-intimal. Les fibroblastes peuvent aussi être impliqués dans les pathologies du remodelage vasculaire.

#### 1.3.1.4 Les fibroblastes

Globalement, les fibroblastes sont spécialisés pour sécréter de la MEC collagénueuse et sont grandement responsables de la structure architecturale de notre corps (177). On les retrouve en quantité importante au niveau de la tunique adventice de la paroi vasculaire où ils jouent un rôle de support et de réparation et ce, dans presque tous les tissus et organes (103, 177). De plus, leur adaptabilité à se différencier en un type de fibroblaste contractile, c'est-à-dire en myofibroblaste, leur permet d'être un joueur important dans les mécanismes de réparation induit par une insulte. En temps normal, les fibroblastes sont dispersés dans l'organisme et sécrètent de la MEC riche en collagène de type I et III (177), mais lorsqu'ils sont stimulés, ils migrent au site d'insulte, prolifèrent, se différencient et produisent une grande concentration de matrice collagénueuse de façon à isoler et réparer le tissu endommagé.

Le modèle de réparation d'une plaie ouverte au niveau de la peau, proposé par Tomasek *et al* (112), nous offre une belle opportunité de comprendre les mécanismes et facteurs impliqués dans l'activation fibroblastique. Dans les tissus normaux du derme, les fibroblastes n'exercent pas de tension sur la MEC dû à l'intégrité de celle-ci et de ses composantes si bien que la formation de l'appareil contractile chez les fibroblastes n'est pas sollicitée. Lors d'une insulte, dans ce cas-ci une lésion au niveau de la peau, la plaie est initialement couverte d'un caillot de fibrine. Ensuite, il y a libération de facteurs de croissance locaux de la part des cellules épithéliales endommagées qui viendront stimuler les fibroblastes sous-jacents à migrer vers la plaie où se trouve une matrice de fibrine provisoire. Cette migration de fibroblastes et de petits vaisseaux qui remplissent la plaie

forment ce qu'il est convenu d'appeler le tissu de granulation. À ce point, les fibroblastes produisent déjà de la fibronectine ED-A, une protéine issue d'un transcrit plus long que la fibronectine normalement retrouvée au niveau du derme et qui joue un rôle important, voire essentiel, au niveau de la différenciation myofibroblastique subséquente (197). La migration des fibroblastes crée une force de tension sur la MEC collagèneuse qui est perçue par les fibroblastes. Ils réorganisent alors leur cytosquelette le long de cette tension, c'est-à-dire le long des lignes de stress, les poussant à générer des fibres de stress intracellulaires et à produire du collagène de façon à acquérir le phénotype de proto-myofibroblaste. Les fibroblastes ont besoin de percevoir le stress, c'est-à-dire la tension exercée au niveau du tissu endommagé, avant d'entreprendre des mécanismes de différenciation cellulaire. Par ailleurs, plusieurs études présentes dans la littérature ont démontré l'importance du PDGF (« Platelet Derived Growth Factor ») dans les phénomènes précoces de différenciation myofibroblastique menant au phénotype du proto-myofibroblaste et ce, lors du développement embryonnaire (198) et de la guérison d'une plaie ouverte chez l'adulte (199). Par contre, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* avec des fibroblastes ont démontré que le PDGF n'est pas en mesure d'induire l'expression d' $\alpha$ -actine musculaire lisse ( $\alpha$ -SMA), une protéine caractéristique au myofibroblaste différencié (200, 201).

#### 1.3.1.5. Le myofibroblaste

Depuis une vingtaine d'années, le myofibroblaste, un fibroblaste spécialisé ayant la propriété de générer des forces contractiles, est considéré comme un joueur important dans l'établissement de la tension durant les processus de

réparation et de remodelage vasculaire tant normaux que pathologiques (202, 203). Il est cependant difficile d'en expliquer l'origine et toutes les fonctions biologiques qu'il régule et ce, dû au fait que le myofibroblaste intègre une multitude de signaux extérieurs provenant à la fois des facteurs de croissance et de ses interactions avec la MEC et les cellules avoisinantes. On sait cependant que les relations cellule-MEC sont primordiales à l'activité myofibroblastique et que le stress cytomécanique exercée au niveau de la plaie et certains facteurs de croissance comme le PDGF et le TGF- $\beta$ 1 (« Transforming Growth Factor  $\beta$ -1 ») sont impliqués dans la transition fibroblaste-myofibroblaste (203, 204).

#### 1.3.1.5.1. Caractéristiques

Morphologiquement, les myofibroblastes sont caractérisés par la présence d'un appareil contractile qui contient des microfilaments d'actine associés à des protéines contractiles de type myosine non-musculaire, un analogue des fibres de stress (203, 205, 206). Ces microfilaments d'actine relient la membrane plasmique du myofibroblaste en un point appelé le fibronexus, un complexe d'adhésion spécialisé qui utilise les intégrines transmembranaires pour lier l'actine intracellulaire aux fibres de fibronectine extracellulaires déjà présentes dans la MEC (206-208). D'un point de vue fonctionnel, ceci provoque une force de tension à partir des fibres de stress intracellulaires qui peut être transmise à la MEC environnante (206). À l'inverse, ce système d'interactions peut être utilisé pour que le myofibroblaste perçoive les stimuli de son environnement (209, 210). Une autre caractéristique du myofibroblaste, que le fibroblaste ne possède pas, est l'expression d' $\alpha$ -SMA. On retrouve aussi l'expression de cette protéine, connue

pour son activité contractile intrinsèque, chez un autre type cellulaire, soit les CML (211, 212). L' $\alpha$ -SMA a la propriété de former des fibres d'actine différentes des fibres de stress, mais tout de même capables d'induire une activité contractile. En fait, les fibres d' $\alpha$ -SMA forment de plus grosses fibres de stress et forment de plus gros complexes d'adhésion fibronexus, dits supermatures (112). D'un point de vue fonctionnel, les myofibroblastes différenciés génèrent une force contractile de plus grande intensité que celle générée par les proto-myofibroblastes et réorganisent davantage les éléments de la MEC, dont la fibronectine et le collagène. Par ailleurs, il existe différents types de myofibroblastes. La plupart expriment l' $\alpha$ -SMA, mais il existe d'autres marqueurs de différenciation myofibroblastique qui font partie d'un phénotype encore plus différencié. Entre autres, certains types de myofibroblastes peuvent exprimer des protéines qui leur sont caractéristiques comme la caldesmone, la desmine et les chaînes lourdes de myosine musculaires lisses semblables à celles exprimées chez les CML (203). À ce sujet, il existe quelques similitudes entre les myofibroblastes et les CML quant à l'expression de certaines protéines ( $\alpha$ -SMA et chaînes lourdes de myosine musculaires lisses), mais il existe aussi une protéine qui peut facilement être utilisée à titre de critère de différenciation : la smootheline (213). Cette dernière n'est pas exprimée par les myofibroblastes tandis que les CML l'expriment.

En rappelant le proto-myofibroblaste du modèle de Tomasek *et al.* portant sur la réparation d'une plaie ouverte au niveau de la peau (112), il est possible de poursuivre avec la formation du myofibroblaste. Donc, les forces de tension exercées au niveau du proto-myofibroblaste, par une réorganisation de ses fibres

de stress, le pousse à sécréter du TGF-B1 et davantage de fibres de fibronectine ED-A. Dans une réponse autocrine, le proto-myofibroblaste se différencie en myofibroblaste et synthétise de l' $\alpha$ -SMA capable d'augmenter les forces contractiles de la cellule (Figure 3). Au même moment, les fibroblastes différenciés produisent du collagène et autres éléments de la MEC en plus de produire différentes protéases capables de moduler la structure de la MEC. Le tout permettra alors le remodelage du tissu endommagé résultant en un rétrécissement de la matrice de fibrine et subséquemment en une diminution de l'ouverture de la plaie jusqu'à sa fermeture, voire jusqu'à sa cicatrisation.

#### 1.3.1.5.2. Rôles

Il a été clairement démontré que les myofibroblastes expriment de l' $\alpha$ -SMA et du collagène de type I, ces processus étant principalement régulés par le TGF-B1 (211, 212, 214). De plus, il a été démontré que les myofibroblastes sont présents dans les tissus de granulation de plaies en guérison et dans plusieurs pathologies fibro-contractives comme la maladie de Dupuytren, l'athérosclérose et la SSc (112). Ces évidences laissent donc croire que le myofibroblaste a pour principales fonctions la production de force contractile et la synthèse de collagène qui mèneront à une réorganisation de la MEC, à la contraction de la plaie et à sa cicatrisation. On obtient généralement une belle cicatrice lorsque les différents types cellulaires impliqués dans les processus de réparation disparaissent du site lésionnel après avoir accompli leur travail respectif. Cependant, il existe plusieurs situations pathologiques associées aux mécanismes du remodelage, qu'elles soient

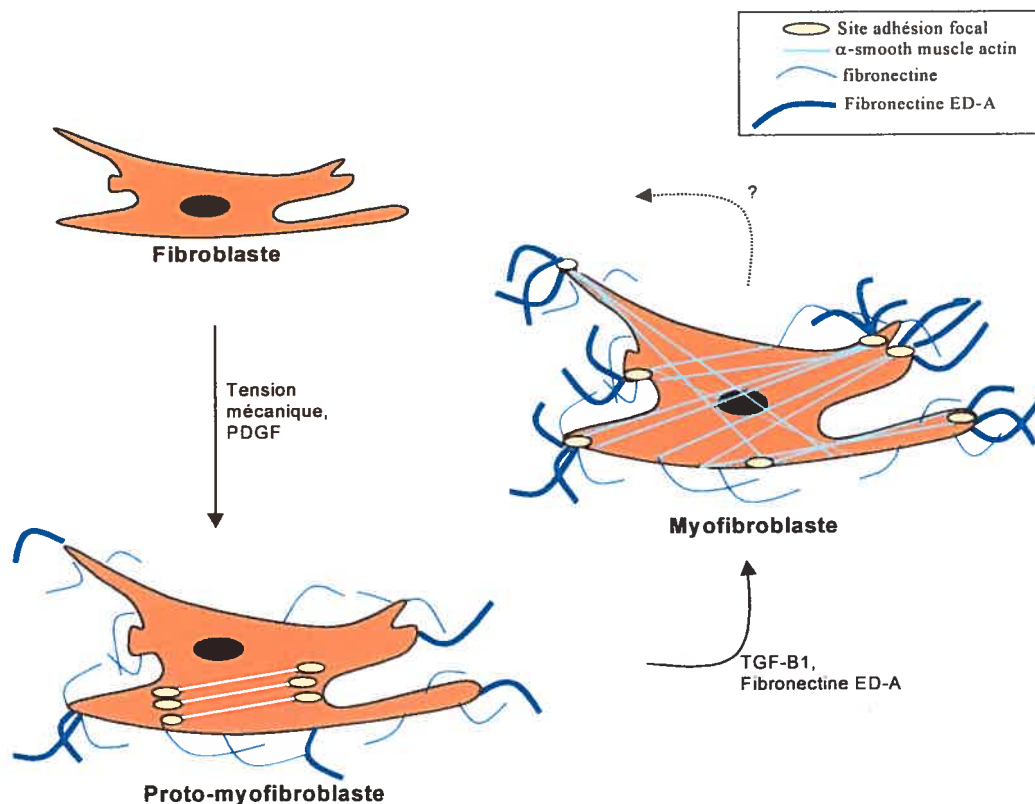


Figure 3. Représentation classique de la différenciation myofibroblastique proposée par Tomasek *et al.* (112). En situation normale, le fibroblaste n'exprime pas de fibres de stress et de complexes d'adhésion avec la matrice extracellulaire (MEC). Suite à une insulte créant une tension mécanique sur la MEC, il y a libération de facteurs de croissance (PDGF) et de médiateurs locaux qui stimuleront la migration des fibroblastes au site lésé. S'en suivra l'acquisition d'un phénotype de proto-myofibroblaste caractérisé par une réorganisation du cytosquelette le long des fibres de stress nouvellement synthétisées et par une production de fibronectine ED-A. D'autres médiateurs, principalement le TGF-B1, assureront la phase finale de différenciation myofibroblastique caractérisée par la synthèse d'actine musculaire lisse ( $\alpha$ -SMA), par la formation de nombreux complexes d'adhésion focaux (fibronexus), par une production de collagène et une

réorganisation subséquente de la MEC. Les fibres de stress et d'  $\alpha$ -SMA exprimées chez le myofibroblaste sont en mesure de générer de grandes forces contractiles sur la matrice environnante permettant ainsi un remodelage des tissus endommagés.



d'ordre vasculaire, pulmonaire ou dermique. On retrouve dans tous ces cas une différenciation persistante de fibroblastes en myofibroblastes et un manque d'apoptose des ces cellules durant la phase finale de réparation, soient deux phénomènes impliqués dans le développement d'une réponse pro-fibrotique. Ceci, selon les cas, a le potentiel d'entraîner une réponse pathologique pouvant aller jusqu'au développement de la fibrose cutanée et viscérale retrouvées en SSc. Les myofibroblastes reçoivent-ils des signaux pro-différenciation d'une façon chronique de la part des cellules endommagées ou deviennent-ils résistants aux signaux pro-apoptotiques? Beaucoup de questions sont encore sans réponse, mais chose certaine, le myofibroblaste est essentiel à l'homéostasie de l'organisme et c'est sa dérégulation qui est responsable de la dysfonction de certains tissus (112).

#### 1.3.1.5.3. Voies d'activation

Des études réalisées avec le TGF-B1 ont démontré son rôle dans l'induction de la différenciation myofibroblastique et dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le myofibroblaste (215, 216). Le TGF-B1 est aussi une cytokine fibrogénique très importante impliquée dans la fibrose de plusieurs tissus et qui peut être sécrétée par plusieurs types de cellules impliquées dans les processus inflammatoires (113). En plus de l'expression d'  $\alpha$ -SMA, le TGF-B1 est responsable de la production de PAI-1 (« Plasminogen Activator Inhibitor-1 »), de la production de collagène de type I et de l'expression de fibronectine, particulièrement une variante de type ED-A (216-220). TGF-B1 est donc un facteur clé dans l'apparition de l'ensemble des caractéristiques du myofibroblaste, autant *in vitro* qu'*in vivo*. La production autocrine de TGF-B1 par les fibroblastes,

tout comme la production issue des cellules endommagées, sont deux facteurs importants dans la préservation de l'activité fibrogénique du myofibroblaste même après le retrait du stimulus inflammatoire (221, 222). Par ailleurs, il a été démontré que l'administration d'interleukine-4 *in vitro* ou de GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ») *in vivo*, deux cytokines pouvant être libérées par les cellules endommagées et les macrophages, sont aussi en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique chez les fibroblastes (200, 223).

Les voies de signalisation activées chez le proto-myofibroblaste par la liaison du TGF-B1 à son récepteur membranaire spécifique représentent une avenue de recherche intéressante quant à une meilleure compréhension des mécanismes de différenciation myofibroblastique. Les récepteurs spécifiques au TGF-B1 de type I et II sont transmembranaires et s'hétérodimérisent suite à la liaison du ligand ce qui permet l'activité intrinsèque sérine/thréonine kinase du complexe protéique ainsi formé (224, 225). S'en suivra une cascade d'activation des Smads qui peuvent agir à titre de facteurs transcriptionnels. Leur activation permet une migration du complexe protéique Smad du cytosol au noyau qui est essentielle à l'activation de gènes cibles impliqués dans la différenciation myofibroblastique (225). Toujours en ce qui concerne cette voie TGF-B1 dépendante, on sait que l'inhibition de l'interaction entre la fibronectine ED-A et la surface de la cellule bloque la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-B1 (226). De plus, la fibronectine ED-A seule, sans TGF-B1, n'induit pas la différenciation myofibroblastique. On suspecte donc des intégrines transmembranaires du

myofibroblaste, dont les  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_9\beta_1$ , de jouer un rôle important dans les interactions cellule-MEC favorisant l'activation des mécanismes de différenciation. De récentes données montrent d'ailleurs que la différenciation myofibroblastique induite par le TGF- $\beta_1$  est dépendante de l'adhésion cellulaire et de la signalisation des intégrines via la FAK (« Focal Adhesion Kinase ») (227). À cet effet, le rôle des intégrines a aussi été répertorié dans le développement d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes (228). L'intégrine  $\beta_1$  est en mesure d'induire la survie des fibroblastes via un mécanisme PI3K/Akt dépendant en réponse aux stimuli de la MEC environnante. On peut donc imaginer un rôle important pour une voie potentielle intégrines-FAK-PI3K/Akt dépendante des interactions du myofibroblaste avec la MEC et qui pourrait réguler les mécanismes de résistance à l'apoptose et de différenciation myofibroblastique.

#### 1.3.1.6. Matrice extracellulaire

Bien qu'en apparence passive, la MEC est une structure active et très dynamique de par sa capacité à se renouveler continuellement (229). La MEC est d'ailleurs une composante importante dans l'architecture de l'organisme et ce, tout au cours du développement de l'organisme et durant les processus de réparation tissulaire. La MEC est dynamique aussi au sens où elle entretient plusieurs interactions avec son environnement lui permettant de répondre aux changements du milieu tout en modulant l'activité fonctionnelle des cellules avoisinantes. N'oublions pas que la MEC joue un rôle central dans les mécanismes de réparation, mais où une déposition excessive de ses éléments peut contribuer à une réponse inflammatoire chronique causant la dégénération du tissu ou la

dysfonction d'un organe. La MEC n'est donc plus considérée comme une charpente inerte ne servant qu'à stabiliser les structures physiques d'un tissu (230), mais bien une entité active régulée par son environnement.

#### 1.3.1.6.1. Composantes

Nos tissus ne sont pas composés que de cellules. Une part substantielle du volume tissulaire est l'espace extracellulaire principalement composé d'un réseau de macromolécules qui constituent la MEC. Cette matrice est composée d'une variété de protéines et polysaccharides sécrétés localement et organisés en réseaux permettant une association avec la surface des cellules qui les ont sécrétés (177). La composante principale de la MEC est le collagène, incluant tous les membres de sa famille : plus de 20 répertoriés à ce jour (231-234). On y retrouve aussi des fibres élastiques, des glycosaminoglycans (GAG), des protéoglycans et des glycoprotéines adhésives (235). Les différentes combinaisons, orientations et organisations spatiales possibles de ces substances sécrétées donnent lieu à la formation d'une variété de réseaux structuraux caractéristiques aux différents tissus et organes qui composent notre corps (235).

Les tissus devant résister aux différentes forces de tension, de pression et de stress comme les tendons, les vaisseaux et la peau ont leur collagène organisé en fibrilles, une caractéristique essentielle leur permettant de développer une force de tension (230). Seulement les collagènes de type I, II, III, V et XI peuvent s'assembler en fibrilles. Le collagène de type I se retrouve partout dans notre corps, à l'exception des cartilages, mais est majoritairement retrouvé au niveau des

tendons, de la peau et des cicatrices hypertrophiées (230). Le collagène de type III est principalement concentré au niveau des parois vasculaires et des organes où il peut s'associer avec le collagène de type I (230). Le collagène de type II est surtout retrouvé au niveau de l'œil tandis que les collagènes de type V et XI ont plus un rôle de coopération avec le collagène I (230). Ces types de collagène sont, en grande partie, synthétisés par les cellules présentes au niveau de la MEC comme les fibroblastes, les myofibroblastes, les ostéoblastes et les chondrocytes. D'autres cellules, comme les cellules épithéliales et endothéliales sont aussi capables de synthétiser du collagène, principalement de type IV (230).

Tel que décrit un peu plus haut, les laminines, nidogènes et protéoglycans comme le perlécan font aussi partie de la MEC, mais sont surtout concentrés au niveau de la membrane basale (230). Une autre composante importante de la MEC est les métalloprotéinases (MMPs), une classe d'enzyme protéolytique reconnue pour leur participation dans les mécanismes de dégradation de la MEC (230). La famille des MMPs compte environ une vingtaine de membres (236) qui ont besoin, pour la plupart, d'être sécrétés pour se retrouver au niveau de la MEC. Plusieurs types de cellules sont d'ailleurs capables de produire certaines MMPs comme les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et myofibroblastes et les leucocytes (230). Plusieurs types de cellules tumorales ont aussi la capacité de sécréter ces enzymes, ce qui facilite leur invasion (237). Les MMPs, de par leur capacité à dégrader la MEC, jouent un rôle physiologique important au cours du développement, du remodelage vasculaire et de la réparation tissulaire. Par contre, elles jouent aussi un rôle pathologique dans des conditions d'inflammation

et d'invasion tumorale (238-241). Plusieurs pistes intéressantes ont été avancées quant à la compréhension des mécanismes pathologiques induits par les MMPs. Par exemple, plusieurs facteurs de croissance comme le FGF et TGF- $\beta$ 1 peuvent être libérés à partir d'éléments de la MEC suite au clivage par certaines MMPs. Entre autres, le clivage des chaînes héparanes sulfate du domaine I du perlécan par les MMPs 1 et 3 permet la libération de FGF tandis que le clivage de la décorine par les MMPs 2-3 et 7 engendre la libération de TGF- $\beta$  (242, 243). De plus, les MMPs 2 et 9 peuvent aussi directement cliver et activer le TGF- $\beta$  en un ligand actif (244). Les MMPs représentent donc un facteur potentiellement dangereux au cours du remodelage vasculaire au sens où un excès de leur activité pourrait suractiver les mécanismes de différenciation myofibroblastique et donc favoriser une réponse pro-fibrotique.

#### 1.3.1.6.2. Interactions cellule-matrice extracellulaire

La différenciation cellulaire et la plasticité de certains types de cellules, incluant les cellules souches adultes, sont régulées d'une façon dépendante à la nature de leur microenvironnement cellulaire (227). Ainsi, des changements rapides et dynamiques se produisent chez certaines cellules lors d'une altération de leur environnement respectif; ce que l'on retrouve souvent dans des exemples d'insulte tissulaire, d'inflammation et de réparation. Les fibroblastes sont reconnus comme étant des participants actifs dans ces processus de remodelage de par leur habileté exceptionnelle à se différencier et à se dédifférencier en réponse aux stimuli extracellulaires. Il devient alors important, dans les mécanismes de remodelage, que les cellules effectrices entretiennent une bonne communication

avec la MEC de façon à favoriser une réponse régulée et sécuritaire. Tel que discuté un peu plus haut, les complexes fibronexus du proto-myofibroblaste (ou fibronexus supermatures chez les myofibroblastes), composés principalement de fibronectine et d'actine, sont un exemple d'interaction cellule-MEC impliquée dans les processus de réparation, mais il en existe bien d'autres. Les différents types de collagène contenus dans la MEC peuvent influencer sur la prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire en se liant à certains protéoglycans transmembranaires retrouvés à la surface cellulaire (245, 246). Ces derniers peuvent aussi se lier à d'autres éléments de la MEC comme la fibronectine et la thrombospondine et certains facteurs de croissance comme peut le faire le syndecan-4 en se liant au FGF (235). À ce sujet, le syndecan-4, impliqué dans le développement et la différenciation cellulaire, est un exemple type de récepteur membranaire non-intégrine retrouvé chez le fibroblaste (247). Aussi, certains GAG de la MEC peuvent se retrouver impliqués dans des interactions cellule-MEC comme l'hyaluronane, un polysaccharide actif au niveau de la migration et la différenciation cellulaire (248).

#### 1.3.1.6.3. Les intégrines

Il devient difficile de donner des exemples d'interactions cellule-MEC sans parler des récepteurs de type intégrine. Les intégrines représentent un large groupe d'une famille de glycoprotéines qui ont des structures hétérodimériques formées par l'association non-covalente de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (235). Le groupe a ainsi été sous-divisé en fonction de l'identité de la sous-unité  $\beta$ , ce qui a donné lieu à l'identification de 24 complexes intégrines  $\alpha\beta$  différents chez les mammifères

(249). La sous-unité  $\beta$  ne semble pas avoir vraiment d'activité spécifique, outre son interaction avec la MEC (250) tandis que la sous-unité  $\alpha$  confère la spécificité d'action à l'intégrine de par sa capacité à activer une signalisation intracellulaire (235). Une fois les molécules de la MEC liées à leur récepteur intégrine spécifique, il y a changement de l'activité au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur lui permettant de s'associer au cytosquelette de la cellule. En fait, la liaison de la MEC au récepteur intégrine entraîne le regroupement et l'activation des sous-unité  $\alpha\beta$ , l'activation de protéines kinases intracellulaires, la phosphorylation d'éléments du cytosquelette et ensuite la transmission de l'information au noyau et à la machinerie transcriptionnelle (251). Ceci aura pour effet d'engendrer le réarrangement du cytosquelette pouvant affecter la forme de la cellule et ainsi, son habileté à proliférer ou à se différencier (252). On considère cette signalisation comme étant de type « outside-in », mais l'utilisation des intégrines peut aussi mener à une signalisation « inside-out » où une signalisation intracellulaire permettrait un changement conformationnel des sous-unités  $\alpha\beta$  du récepteur intégrine le rendant ainsi plus ou moins susceptible d'interagir avec son ligand spécifique de la MEC (249, 253). La plupart des composantes de la MEC peuvent être reconnues par un ou plusieurs récepteurs intégrine (254), mais la réponse à cette interaction n'est pas connue dans tous les cas. Chose certaine, l'activité des récepteurs intégrine a été répertoriée chez plusieurs organismes vivants lors de réponses immunologiques et lors de réponses inflammatoire (maladies cardiaques, cancer). Ce sont donc un groupe de protéines à considérer comme potentiellement important dans l'acquisition de phénotypes fibrotiques lors des mécanismes de réparation infructueux.



#### 1.3.1.6.3.1. Intégrine vs Apoptose

Un régulateur important de l'apoptose est l'adhésion intégrine dépendante. Le détachement de cellules à partir de la MEC par une perte d'ancrage est la cause de la mort cellulaire apoptotique de plusieurs types cellulaires. Ce type d'apoptose est d'ailleurs nommé anoïkis (255, 256). Les intégrines ont la propriété d'inhiber l'anoïkis en assurant l'ancrage des cellules à la MEC tout en activant des voies de signalisation pro-survie et en inhibant les voies de signalisation pro-apoptotiques. Une récente étude publiée par Reginato *et al.* a démontré que la protéine pro-apoptotique Bim est réprimée d'une façon dépendante à l'activation des ERK1/2 chez les cellules épithéliales adhérentes à la MEC. Ils ont montré, à l'aide de leur système expérimental, que la liaison de l'intégrine B1 à la matrice environnante est à la fois nécessaire à l'activation du récepteur EGF et de la voie de signalisation ERK 1/2 prévenant ainsi du même coup l'expression protéique de Bim et l'anoïkis (257). Par ailleurs, plusieurs autres voies intégrines dépendantes utilisent l'activité de la FAK intracellulaire pour parvenir à induire un phénotype anti-apoptotique. Ceci résulte en une activation de la PI3K et de la voie PI3K/Akt qui ultimement pourra favoriser la survie de plusieurs types cellulaires dont les fibroblastes qui utilisent aussi la B1 intégrine à cette fin (228, 258-260). En fait, Akt est reconnue pour sa capacité à inactiver les protéines pro-apoptotiques Bad, Bim et caspase-9 en plus d'avoir plusieurs répercussions au niveau de la transcription de gènes apoptotiques (257, 261, 262). Les relations cellule-MEC, via les intégrines, représentent donc une source importante de régulation de l'apoptose. Les différentes voies de signalisation ainsi activées suite à l'activation

des intégrines sont donc importantes et potentiellement impliquées dans l'établissement des différents phénotypes apoptotiques.

#### 1.3.1.6.3.2. Intégrine vs Différenciation myofibroblastique

Les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  ont de leur côté été répertoriées chez des fibroblastes en culture pour avoir un rôle dans la contraction de la matrice collagénueuse (228). Ces forces de tension exercées sur la MEC sont normalement caractéristiques au développement de la différenciation myofibroblastique, ce qui suggère un rôle important pour les intégrines dans ce processus. À cet effet, Thannickal *et al.* ont récemment démontré que la différenciation myofibroblastique induite par la liaison de TGF-B1 aux fibroblastes est dépendante de l'activation de la FAK; cette activation étant pour sa part dépendante de l'adhésion de la cellule à la matrice via ses intégrines transmembranaires (possiblement  $\alpha 4\beta 1$  ou  $\alpha 5\beta 1$ ) (227). L'activation des FAK par phosphorylation crée un site d'ancrage pour la PI3K qui s'en trouve du coup activée (263). On se doit donc de considérer la voie de signalisation PI3K/Akt dans les processus de différenciation myofibroblastique et ce, d'un point de vue normal et pathologique. Le rôle exact de la FAK sur la différenciation myofibroblastique et la transcription de gènes qui lui sont caractéristiques reste cependant à confirmer. En effet, l'activité de la FAK pourrait à la fois être dépendante de l'adhésion de la cellule à son environnement et/ou de la signalisation intracellulaire activée par des facteurs de croissance comme le TGF-B1, soient deux sources distinctes de signalisation pouvant être impliquées dans la différenciation myofibroblastique. En ce qui attrait à la voie de signalisation PI3K/Akt, nous savons qu'elle joue un rôle central dans l'ensemble

des activités cellulaires ayant à la fois des impacts sur l'apoptose, la différenciation myofibroblastique et possiblement le développement de la sclérose systémique.

## **2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

## 2.1. *Prémisses*

L'atteinte endothéliale est un évènement initial essentiel au remodelage vasculaire et est caractérisé par une augmentation de l'apoptose endothéliale au site d'insulte.

L'apoptose des CE représente un facteur initiateur dans le développement d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes et dans la différenciation myofibroblastique caractéristiques de plusieurs pathologies à connotation fibrotique telles que la sclérose systémique et la microangiopathie thrombotique.

Le déséquilibre entre les taux d'apoptose des différents constituants cellulaires de la paroi vasculaire joue donc un rôle important dans les pathophysiologies du remodelage vasculaire.

Cependant, les relations existantes entre l'apoptose endothéliale et le développement d'une réponse fibrotique sont aujourd'hui encore mal définies.

Des données obtenues au laboratoire du Dre Hébert ont déjà démontré que l'apoptose endothéliale entraîne la libération de nouveaux médiateurs paracrins qui comprend, entre autres, un fragment C-terminal du domaine V du perlécan.

Ceux-ci ont la propriété d'inhiber l'apoptose des CE et des VSM.

Ces répercussions caractéristiques aux divers programmes apoptotiques pourraient étre mises en marche de façon à stimuler le remodelage vasculaire et donc la réparation du tissu/vaisseau tout en empêchant une dénudation de la paroi.

## 2.2. Hypothèse

L'apoptose des cellules endothéliales permet une libération paracrine de nouveaux médiateurs solubles favorisant dans un premier temps un état de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes et plus tardivement un phénomène de différenciation myofibroblastique.

À cet effet, nous pensons donc que l'apoptose est un type de mort cellulaire propre et bien régulé, mais pas nécessairement silencieux tel que soutenu par la littérature au sens où il y aurait des répercussions paracrines de ce suicide sur son environnement.

### 2.3 Objectifs

Mon projet de maîtrise consistait à

1- Définir la réponse paracrine induite chez les fibroblastes par les médiateurs issus de CE apoptotiques, ce qui consiste à

1.1.- Caractériser, au niveau moléculaire, la réponse anti-apoptotique induite chez les fibroblastes par ces médiateurs et à

1.2.- Caractériser le phénotype myofibroblastique induit à long terme par ces mêmes médiateurs

2- Évaluer la sensibilité de fibroblastes provenant de lésions sclérodermiques à l'activité anti-apoptotique des médiateurs issus de CE apoptotiques en comparaison avec des fibroblastes contrôles normaux.

### **3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**



3.1. *Article #1*

**Apoptosis of endothelial cells triggers the release of cryptic mediators : a novel pathway for initiation of fibrosis**

par

Patrick Laplante, Marc-André Raymond, Gabrielle Gagnon, Normand Vigneault,  
Monique Bernard, Yves Raymond, Marie-Josée Hébert

soumis au

*Journal of Cell Biology* le 8 juillet 2004

**Rôle des coauteurs dans cet article :**

-J'ai planifié et réalisé les expériences présentées dans l'article qui suit. En fait, j'ai caractérisé le phénotype anti-apoptotique et myofibroblastique induit chez le fibroblaste par les médiateurs issus de CE apoptotiques. J'ai aussi réalisé les expériences avec les fibroblastes provenant de lésions sclérodermiques. Par ailleurs, j'ai su analyser et interpréter les résultats générés ce qui m'a permis de participer à l'écriture de l'article avec l'aide du D<sup>re</sup> Hébert, mon directeur de recherche.

-Marc-André Raymond a effectué quelques expériences préliminaires sur l'effet anti-apoptotique induit par les médiateurs issus de CE apoptotiques chez le fibroblaste. De plus, il a continuellement généré le milieu conditionné par des CE apoptotiques (SSC) en plus de participer à sa caractérisation biochimique.

-Gabrielle Gagnon a participé à quelques expériences d'immunobuvardage en plus de participer à l'écriture de l'article.

-Normand Vigneault a aussi participé aux expériences d'immunobuvardage en plus de participer à la caractérisation biochimique des médiateurs présents dans le milieu SSC.

-Monique Bernard a participé aux expériences portant sur les fibroblastes provenant de lésions sclérodermiques.

-Yves Raymond a fourni les fibroblastes provenant de lésions sclérodermiques en plus de participer activement aux discussions portant sur la rédaction de l'article.

-Marie-Josée Hébert a joué un rôle déterminant au niveau de la planification des expériences et de la rédaction de l'article.

## Abstract

Fibrotic diseases such as systemic sclerosis are initiated by apoptosis of endothelial cells (EC) followed by development of an anti-apoptotic phenotype in fibroblasts and myofibroblast differentiation. Yet the mechanistic interplay between EC apoptosis and fibrosis remain largely undefined. We report that apoptosis of EC triggers the release of mediators which inhibit apoptosis of fibroblasts through activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), downstream repression of Bim-EL, and up-regulation of Bcl-XL. These mediators also induce PI3K-dependent myofibroblast differentiation. Chondroitin 4-sulfate and an EGF motif present on a C-terminal fragment of perlecan, which we characterized previously as a mediator produced by apoptotic EC, inhibit apoptosis of fibroblasts and favor myofibroblast differentiation. Fibroblasts derived from human sclerodermic lesions are more sensitive to the anti-apoptotic activity of these motifs. We suggest that endothelial apoptosis initiates a finely regulated paracrine response aimed at fostering repair at sites of injury. Sustained activation of this paracrine response could form the basis of a maladaptive healing process characteristic of fibrosis.

## Introduction

Systemic sclerosis is an autoimmune disorder characterized by early endothelial cell (EC) damage followed by development of cutaneous as well as visceral fibrosis (Jun et al., 2003). Fibrosis occurs in association with acquisition of an anti-apoptotic phenotype in fibroblasts and differentiation of fibroblasts toward the myofibroblastic phenotype (Gabbiani, 1998; Tomasek et al., 2002). The myofibroblast, a specialized and contractile type of fibroblast, is a normal cellular constituent of healing tissues. It is characterized by the presence of stress fibres that contain  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) and increased production of collagen I and III (Tomasek et al., 2002). During normal wound healing, myofibroblasts play a central role in extra-cellular matrix (ECM) deposition and subsequent wound contraction. After completion of tissue or vascular remodelling, repair is terminated by clearance of myofibroblasts and superfluous fibroblasts through apoptosis (Desmoulières et al., 1996; Gabbiani, 1998; Tomasek et al., 2002). In fibrotic disorders, which in many ways resemble a form of sustained repair, healing fails to terminate due to lack of apoptosis in fibroblasts and myofibroblasts (Desmoulières et al., 1996; Jun et al., 2003; Tomasek et al., 2002).

Mounting evidence suggests that apoptosis of EC is a primary pathogenic event in systemic sclerosis (Jun et al., 2003; Sgonc et al., 1996). Increased endothelial apoptosis was shown to represent the earliest microvascular abnormality in an animal model of systemic sclerosis and to precede fibrotic changes (Sgonc et al., 1996). Anti-EC antibodies, found in a majority of

sclerodermic patients, are known to induce EC apoptosis both *in vitro* (Bordon et al., 1998) and *in vivo* (Worda et al., 2003). Studies in early inflammatory human sclerodermic lesions have also supported the contention that endothelial apoptosis is an initial triggering phenomenon in systemic sclerosis (Sgonc et al., 1996).

We showed previously that endothelial apoptosis triggers the release of novel paracrine mediators, which include a C-terminal fragment of perlecan (Raymond et al., 2004). These mediators, in turn, increase proliferation and inhibit apoptosis of EC and vascular smooth muscle cells (Raymond et al., 2004; Raymond et al., 2002). Based on these results, we proposed that paracrine repair pathways are “built in” the apoptotic programme in order to prevent widespread apoptotic cell death and initiate repair after cell deletion by apoptosis (Raymond et al., 2004). In the present work, we evaluated whether mediators released by apoptotic EC favor the development of an anti-apoptotic phenotype in fibroblasts and myofibroblast differentiation. We also evaluated whether these mediators activate the PI3K/Akt pathway in fibroblasts, as this signalling pathway has been recently implicated in resistance to apoptosis and myofibroblast differentiation of human systemic sclerosis skin fibroblasts (Jun et al., 2003). Finally, we evaluated whether fibroblasts derived from sclerodermic patients display an increased sensitivity to mediators produced by apoptotic EC.

## Results

### *Apoptosis of EC triggers the release of anti-apoptotic factors active on fibroblasts*

Apoptosis of HUVEC was induced with serum starvation for 4 hours to generate serum-free medium conditioned by apoptotic EC (SSC) as we described previously (Hébert et al., 1998; Raymond et al., 2004; Raymond et al., 2002). In turn, this conditioned medium was used to serum starve human embryonic pulmonary fibroblasts (WI-38) for 24 hours. Apoptosis was significantly reduced in fibroblasts exposed to SSC as compared with fresh serum-free medium (SS) (Fig.1A). Inhibition of apoptosis in fibroblasts was also documented after long-term (7 days) exposure to SSC (Fig.1A). To test whether mediators produced by serum-starved EC induce a broad anti-apoptotic phenotype, fibroblasts were exposed to bleomycin in presence of SSC or SS for 24 hours. Bleomycin is a DNA damaging agent associated with the development of systemic sclerosis in animals and humans (D'Cruz, 2000). Fibroblasts exposed to bleomycin in the presence of SSC showed a significantly decreased apoptotic response as compared to fibroblasts exposed to bleomycin in serum-free medium (Fig 1B). To test whether biologically active mediators present in SSC are released by apoptotic EC, apoptosis of EC during conditioning was blocked with a pan-caspase inhibitor. HUVEC were exposed to ZVAD-FMK (100  $\mu$ M) or vehicle (dimethylsulfoxide: DMSO) for 2 hours. ZVAD-FMK and vehicle were then removed, HUVEC were washed and serum starved for 4 hours. We showed previously that pre-incubation with ZVAD-FMK significantly decreased the

percentage of apoptotic EC after 4 hours of serum starvation whereas pre-incubation with DMSO did not (Raymond et al., 2004). Serum-free medium conditioned by EC in which caspase activation was blocked (SSC-ZVAD) failed to induce resistance to apoptosis in fibroblasts (Fig. 1C). These results suggest that anti-apoptotic mediators active on fibroblasts are released by apoptotic EC downstream of caspase activation.

*Central role for PI3K in development of an anti-apoptotic phenotype in fibroblasts*

Fibroblasts exposed to SSC for 1 and 4 hours showed increased phosphorylation of Akt as compared with normal medium (N) and SS (Fig 2A). Co-incubation of fibroblasts for 24 hours with SSC and LY294002, a biochemical inhibitor of PI3K, blocked the development of resistance to apoptosis (Fig 2B). We went on to characterize the molecular mechanisms of resistance to apoptosis activated downstream of PI3K in fibroblasts exposed to mediators released by apoptotic EC. Protein levels of p53, cIAP1, cIAP2, xIAP and Bcl-2 were unaltered in fibroblasts exposed to SSC for up to 7 days as compared with SS (data not shown). Protein levels of the pro-apoptotic molecule Bim-EL increased in fibroblasts exposed to SS for 4 hours (data not shown) and 24 hours (Fig 2C) whereas SSC prevented the upregulation of Bim-EL (Fig 2C). Co-incubation of fibroblasts with LY294002 in the presence of SSC restored the upregulation of Bim-EL (Fig 2C) and the apoptotic response (Fig 2B). Blocking Bim-EL expression with RNA interference in fibroblasts exposed to SS inhibited development of apoptosis (Fig 2 D and E), demonstrating the mechanistic

importance of Bim-EL in activation of apoptosis in fibroblasts. RNA interference for Bim-EL in fibroblasts exposed to SSC did not further reduce Bim EL-expression or apoptosis (Fig 2 D and E), suggesting that Bim-EL activity was maximally reduced in the presence of SSC. These results suggest that mediators released by apoptotic EC inhibit apoptosis of fibroblasts through PI3K-dependent repression of Bim-EL expression.

Over the long term (4 and 7 days), resistance to apoptosis mediated by SSC was associated with a progressive increase in the protein levels of the anti-apoptotic molecule Bcl-Xl (Fig.2F). Co-incubation of fibroblasts with SSC and LY294002 for 7 days blocked the development of a long-term anti-apoptotic phenotype in fibroblasts (Fig 2 G). LY294002 was also found to attenuate Bcl-Xl up-regulation in fibroblasts exposed to SSC for 7 days (Fig 2H). Hence, these results suggest that mediators released by apoptotic EC induce resistance to apoptosis in fibroblasts through PI3K-dependent sequential modulation of Bim-EL and Bcl-Xl protein levels.

***A fragment of the domain V of perlecan induces resistance to apoptosis in fibroblasts***

We showed previously that a C-terminal fragment of the domain V of perlecan, which comprises one EGF-motif and an anchoring site for chondroitin 4-sulfate, is one of the bioactive mediator(s) produced by apoptotic EC (Raymond et al., 2004). In the present work, we found that apoptosis was inhibited in fibroblasts exposed for 24 hours to SS supplemented with either chondroitin 4-sulfate (CS) or a synthetic peptide containing the EGF motif present in the



perlecan fragment (Fig.3A). LY294002 blocked the anti-apoptotic response induced by CS and the synthetic peptide (Fig 3B). Bim-EL upregulation was significantly decreased in fibroblasts exposed for 24 hours to SS supplemented with either CS or the synthetic peptide (Fig 3C).

On the long term, fibroblasts exposed for 7 days to SS supplemented with CS developed an anti-apoptotic phenotype whereas fibroblasts exposed to the synthetic peptide for 7 days failed to show resistance to apoptosis (Fig 3D). Resistance to apoptosis was blocked in fibroblasts exposed for 7 days to CS in the presence of LY294002 (Fig 3E), suggesting that the anti-apoptotic phenotype induced by CS also develops downstream of PI3K activation. Fibroblasts exposed to serum-free medium supplemented with CS for 7 days showed increased Bcl-Xl protein levels (Fig 3 F) whereas exposure to the synthetic peptide, which did not inhibit apoptosis of fibroblasts, failed to up-regulate Bcl-Xl protein levels (Fig.3F). These results suggest that motifs present on the C-terminal fragment of perlecan can recapitulate the molecular pattern of apoptosis inhibition induced by SSC.

#### ***Mediators produced by apoptotic EC induce myofibroblast differentiation***

We evaluated whether mediators produced by apoptotic EC also regulate myofibroblast differentiation. Fibroblasts exposed to SSC for 7 days showed increased protein levels of  $\alpha$ SMA and desmin as compared with fibroblasts maintained in N and SS (Fig. 4A). Production of collagen type I was increased by two folds in fibroblasts exposed to SSC as compared with fibroblasts exposed to SS for the same duration (Fig.4B). Increased immunostaining for  $\alpha$ SMA and

increased formation of stress fibres were found in fibroblasts exposed for 7 days to SSC as compared to N and SS (Fig.4 C and D). SS supplemented with TGF- $\beta$ 1, a classical inducer of myofibroblast differentiation (Thannickal et al., 2003; Vaughan et al., 2000) is shown as a positive control (Fig.4 C and D). Inhibition of PI3K with LY294002 in fibroblasts exposed to SSC for 7 days prevented the upregulation of  $\alpha$ SMA as compared with vehicle (SSC-DMSO) and SSC (Fig.4E). These results suggest that mediators released by apoptotic EC induce PI3K-dependent myofibroblast differentiation.

TGF- $\beta$ 1 is appreciated as a central mediator of myofibroblast differentiation (Thannickal et al., 2003; Tomasek et al., 2002). However, TGF- $\beta$ 1 levels measured in SSC were not different from levels found in normal culture medium (N), which did not induce myofibroblast differentiation (SSC:  $0.08 \pm 0.04$  ng/mL, N:  $0.16 \pm 0.07$  ng/mL,  $p > 0.05$ ). This suggested that TGF- $\beta$ 1 is not the primary active fibrogenic factor produced by apoptotic EC. Thus, we tested whether motifs present on the C-terminal fragment of perlecan induce myofibroblast differentiation. Fibroblasts exposed for 7 days to SS supplemented with either CS or the synthetic peptide containing the EGF motif present in the perlecan fragment showed increased protein levels of  $\alpha$ SMA (Fig.4E). Again, co-incubation with LY294002 blocked overexpression of  $\alpha$ SMA induced by either CS or the synthetic peptide. These results suggest that, akin to SSC, the C-terminal fragment of the domain V of perlecan contains motifs capable of inducing PI3K-dependent myofibroblast differentiation. In contrast, CS or the synthetic peptide did not up-regulate desmin protein levels or increase the production of collagen I (data not shown), suggesting that additional mediators present in SSC act

coordinately with the fragment of perlecan in order to induce all features of myofibroblast differentiation.

***Systemic sclerosis fibroblasts display increased sensitivity to the anti-apoptotic activity of chondroitin 4-sulfate and the synthetic peptide.***

The anti-apoptotic activities of SSC, CS and the synthetic peptide were evaluated on fibroblasts derived from fibrotic skin areas of systemic sclerosis patients or normal controls. Both normal and sclerodermic fibroblasts displayed increased apoptosis after exposure to serum-free medium for 24 hours and inhibition of apoptosis in presence of SSC (Fig.5A and B). In fibroblast cell lines derived from normal controls and exposed to serum-free medium supplemented with CS, the anti-apoptotic response developed at a concentration of 500 ug/ml (Fig.5A) whereas concentrations of 60 to 125 ug/ml inhibited the development of apoptosis in all untransformed fibroblast cell lines derived from systemic sclerosis skin lesion (Fig.5B). In fibroblast cell lines derived from normal controls, a concentration of 10 ug/ml or more of the synthetic peptide was required to induce an anti-apoptotic response (Fig.5A) whereas resistance to apoptosis developed at a concentration of 100ng/mL (systemic sclerosis cell lines #1 and 2) to 1 ug/ml (systemic sclerosis cell lines #3 and 4) in fibroblasts derived from sclerodermic skin lesions (Fig.5B).

## Discussion

Increased apoptosis of EC is appreciated as a primary event in systemic sclerosis (Bordon et al., 1998; Jun et al., 2003; Sgonc et al., 1996). Human biopsies of early systemic sclerosis skin lesions in humans and animal models of systemic sclerosis have demonstrated that apoptosis of EC precedes the development of fibrosis (Sgonc et al., 1996). It is also widely accepted that fibrosis develops in association with the acquisition of long-term resistance to apoptosis in fibroblasts and myofibroblast differentiation (Desmoulières et al., 1996; Jelaska and Korn, 2000; Santiago et al., 2001; Tomasek et al., 2002). During the normal healing process activated following various forms of tissue or vascular injuries, fibroblasts migrate to the site of damage, develop a state of increased resistance to apoptosis and differentiate into myofibroblasts (Gabbiani, 1998; Shi et al., 1996; Tomasek et al., 2002). This in turn contributes to ECM remodelling and favors the development of tensile forces at sites of injury (Gabbiani, 1998; Tomasek et al., 2002). Fibrosis, which in many ways resembles a form of perpetual repair, occurs when fibroblasts and myofibroblasts fail to disappear by apoptosis once healing is completed (Desmoulières et al., 1996; Gabbiani, 1998; Tomasek et al., 2002). Yet the mechanisms that prevent apoptosis of fibroblasts and myofibroblasts at completion of repair and thus initiate a fibrogenic maladaptive process in response to endothelial injury have remained largely undefined.

We have previously shown that apoptosis of EC triggers the active release of mediators with a robust anti-apoptotic activity on vascular smooth muscle cells

and EC (Raymond et al., 2004; Raymond et al., 2002). We suggested that apoptosis contains within its molecular program a paracrine component aimed at fostering repair after an apoptotic insult (Raymond et al., 2004). In the present report, we evaluated the possibility that, as part of these “built-in” repair pathways, apoptosis of EC triggers the release of mediators active on fibroblasts. Indeed, we found that serum-free medium conditioned by apoptotic EC contains anti-apoptotic mediators broadly active on human embryonic pulmonary fibroblasts (WI-38 fibroblasts) and skin fibroblasts derived from normal and systemic sclerosis patients. Serum-free medium conditioned by EC in which caspase activation was inhibited did not induce resistance to apoptosis in fibroblasts, demonstrating that anti-apoptotic mediators are released by EC downstream of caspase activation.

PI3K is a key signalling pathway involved in the regulation of cell survival and myofibroblast differentiation (Scaffidi et al., 2001; Thannickal et al., 2003). Recent reports have suggested that the anti-apoptotic phenotype characteristic of sclerodermic fibroblasts develops in association with PI3K activation and increased phosphorylation of Akt at sites of sclerodermic skin lesions (Jun et al., 2003). In keeping with a potentially important role for endothelial apoptosis in the activation of fibrogenic pathways, our results show that mediators produced by apoptotic EC induce resistance to apoptosis in fibroblasts largely through PI3K-dependent mechanisms. We found increased phosphorylation of Akt in fibroblasts exposed to serum-free medium conditioned by apoptotic EC. Inhibition of PI3K activation in fibroblasts with LY294002 blocked the anti-apoptotic activity of mediators produced by apoptotic EC. Resistance to apoptosis in fibroblasts was

found to be sequentially associated with decreased Bim-EL protein levels followed by increased Bcl-Xl protein levels, both occurring downstream of PI3K activation.

We showed previously that a C-terminal fragment of the domain V of perlecan, which comprises an EGF-motif and an anchoring site for chondroitin sulfate, is one of the bioactive mediator(s) produced by apoptotic EC (Raymond et al., 2004). Our present results demonstrate that the molecular pattern of resistance to apoptosis induced in fibroblasts by mediators produced by apoptotic EC can be largely reproduced by motifs present on the C-terminal fragment of perlecan. Chondroitin sulfate and a synthetic peptide containing the last EGF motif of the domain V of perlecan induced PI3K-dependent resistance to apoptosis in fibroblasts and prevented Bim-EL up-regulation. Chondroitin sulfate also induced long-term PI3K-dependent resistance to apoptosis in fibroblasts in association with increased Bcl-Xl protein levels.

As fibrosis develops through the coordinate actions of increased resistance to apoptosis in fibroblasts and sustained myofibroblast differentiation (Tomasek et al., 2002), we evaluated whether long term exposure of fibroblasts to mediators produced by apoptotic EC induces phenotypic changes characteristic of myofibroblast differentiation. Fibroblasts exposed to medium conditioned by apoptotic EC presented various characteristics of myofibroblast differentiation including increased expression of desmin,  $\alpha$ SMA and stress fibers and increased production of collagen I. Myofibroblast differentiation was also found to be tightly linked to PI3K activation as LY294002 prevented the up-regulation of  $\alpha$ SMA protein levels in fibroblasts exposed to mediators produced by apoptotic

EC. Motifs present on the C-terminal fragment of perlecan were found to induce PI3K-dependent increased expression of  $\alpha$ SMA, the most significant marker of myofibroblastic cells (Gabbiani, 1998). However, these motifs did not induce desmin overexpression or increased production of collagen I, suggesting that mediators released by apoptotic EC and as yet uncharacterized act coordinately with the C-terminal fragment of perlecan in order to promote complete myofibroblast differentiation.

To further test the potential clinical importance of these mediators on fibrogenesis, we evaluated whether systemic sclerosis fibroblasts display increased sensitivity to the anti-apoptotic activity of chondroitin sulfate and the synthetic peptide. The anti-apoptotic response developed in normal fibroblasts at a concentration of chondroitin sulfate four times higher or more than that needed to inhibit apoptosis in fibroblasts derived from sclerodermic skin lesions. This increased sensitivity was even more pronounced for the synthetic peptide, which induced an anti-apoptotic response in normal fibroblasts at a concentration 10 to 1000 fold higher than that needed to inhibit apoptosis in systemic sclerosis fibroblasts.

Akin to the involution of structures during development, tissues and vessels are reshaped after injury through finely regulated processes that control proliferation, differentiation and apoptosis (Meier et al., 2000). These processes need to be dynamically coordinated so that cells which may gain a survival advantage at initiation of repair, such as fibroblasts, myofibroblasts and smooth muscle cells, are cleared by apoptosis once healing is completed (Desmoulières et al., 1996; Tomasek et al., 2002). In the past decade, apoptosis research has largely

focused on deciphering the intra-cellular pathways regulating commitment and execution of apoptosis in various cell types (Hengartner, 2000; Meier et al., 2000). The paracrine consequence of apoptosis within a given environment has received much less attention. The present results and past work from our group (Raymond et al., 2004; Raymond et al., 2002) suggest that apoptosis initiates a complex and finely regulated paracrine response aimed at fostering repair at sites of injury. Apoptosis of EC triggers a caspase-dependent release of novel mediators which include a C-terminal fragment of perlecan. There is no caspase cleavage site in the C-terminal region of the domain V of perlecan, suggesting that an endoprotease(s), as yet uncharacterized and activated downstream of caspases in apoptotic EC, is responsible for the proteolysis of perlecan. Generation of bioactive mediators by apoptotic cells through proteolysis of ECM components represents an energy-efficient solution for triggering repair pathways, since the apoptotic proteolytic machinery would serve concomitantly at the execution of apoptosis and release of cryptic bioactive factors. The ECM is a known reservoir of growth factors and cryptic bioactive factors (Iozzo and San Antonio, 2001; Kalluri, 2003; McCawley and Matrisian, 2001), whereas cues from cell-matrix interactions are key to maintenance of cell survival (Frisch and Screaton, 2001; Reginato et al., 2003). Our results suggest that apoptosis of EC represents a novel mechanism for the induction of ECM proteolysis and production of cryptic bioactive factors activating normal repair mechanisms such as the acquisition of resistance to apoptosis in fibroblasts and myofibroblast differentiation (Fig. 6). These results also suggest that persistent activation of endothelial apoptosis presents an unrecognized potential towards the initiation of



fibrosis. Sustained production of mediators by EC chronically exposed to apoptotic stimuli or with an intrinsic tendency towards apoptosis could perturb the homeostatic regulation of apoptosis in fibroblasts and myofibroblasts. Hence, a chronic increase in endothelial apoptosis and/or increased sensitivity of fibroblasts to mediators produced by apoptotic EC could form the basis of a maladaptive healing process characteristic of fibrotic diseases such as systemic sclerosis.

## Methods

### *Patients and cell lines.*

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Clonetics (San Diego, CA), grown in Endothelial Cell Basal Medium (EBM, Clonetics, San Diego, CA) and used at passages 2 to 4. WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue were obtained from ATCC (Rockville, MD), grown in Fibroblast Basal Medium (Cambrex, Walkersville, MD) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Medicorp, Montreal, QC, Canada) and used at passages 2 to 17. Primary human fibroblasts were isolated from adult skin biopsies obtained from areas of clinically lesional skin of patients with systemic sclerosis or normal adult skin as previously described (Auger et al., 1995). This procedure was approved by the local Institutional Review Board. Fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% inactivated FBS and used at passages 3 to 8.

### *Screening for apoptosis with fluorescence microscopy.*

Fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilised adherent cells stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) (HT) and propidium iodide (PI) was used as described in our previous work (Hébert et al., 1998; Hébert et al., 1996; Raymond et al., 2004; Raymond et al., 2003; Raymond et al., 2002). In brief, cells were grown to confluence in 24-well polycarbonate culture plates (Becton-Dickinson, NJ). HT

(1 µg/ml) was added for 10 min at 37°C and cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). PI was added to a final concentration of 5 µg/ml immediately before fluorescence microscopy analysis (excitation filter  $\lambda$  = 360-425 nm). The percentages of normal, apoptotic and necrotic cells adherent to the dish were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions.

Viable cells display normal nuclear and cytoplasmic morphology and stain blue. Early apoptotic cells are characterized by cell shrinkage, nuclear condensation and preservation of plasma membrane integrity. Chromatin condensation is associated with enhanced fluorescence for HT (bright blue) whereas preservation of cell membrane integrity precludes PI staining. Late apoptotic cells (also called secondary necrosis) are characterized by presence of characteristic apoptotic nuclear changes and loss of cell membrane integrity associated with PI staining. Primary necrotic cells are characterized by increased cell size, absence of chromatin condensation and disruption of cell membrane integrity.

### ***Immunoblotting***

Proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed as described previously (Raymond et al., 2004; Raymond et al., 2003; Raymond et al., 2002). The following antibodies were used: anti-Bcl-Xl (PharMingen, San Diego, CA), anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Bim-EL (Calbiochem, San Diego, CA), anti-Bcl-2 (PharMingen Canada Inc., Mississauga, ON, Canada), anti- $\alpha$ -SMA (Sigma, Saint Louis, MI) and anti-desmin (Sigma, Saint Louis, MI), anti-cIAP1 /

cIAP2 / XIAP (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-Phospho-Akt (Ser473) and anti-Akt (Cell Signalling Technology Inc., Beverly, MA). All membranes were stripped (2 % SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7) at 50°C for 30 min. with gentle shaking and reprobed with anti- $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody (Oncogene, Boston, MA) as a control for protein loading.

### *Immunostaining for characterization of myofibroblast differentiation*

**Immunofluorescence:** 1.  **$\alpha$ -SMA:** cells grown on glass coverslips were rinsed with PBS, fixed in methanol (5 min), acetone (10 min) and dried at room temperature followed by three washes with PBS prior to permeabilization and after each subsequent step. Permeabilization was performed in PBS/Tween-80 1% for 15 minutes. Coverslips were then blocked with PBS/BSA (bovine serum albumin) 3% for 15 minutes and incubated with mouse monoclonal anti- $\alpha$ -SMA antibody (Sigma, Saint Louis, MI) and FITC-labelled anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), each for 60 minutes at room temperature. Cells were visualised at room temperature using a Nikon Eclipse-E600 microscope and MetaMorph-4.6r9 acquisition software. 2. **Stress fibres:** cells were grown on glass coverslips, rinsed with PBS and fixed with 2% formaldehyde / 4% sucrose in PBS. Cells were washed three times in PBS prior to permeabilization and after each subsequent step. Permeabilization was performed with 50nM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 0.3% Triton X-100 in PBS for 15 minutes. Coverslips were blocked with PBS/BSA 3% for 30 minutes and incubated with phalloidin-tetramethylrhodamine antibody (Sigma, Saint Louis, MI) for 60 minutes at room

temperature. Cells were then visualised at room temperature using a Nikon Eclipse-E600 microscope and MetaMorph-4.6r9 acquisition software.

### ***RNA interference***

WI-38 fibroblasts were plated onto 6 well-plates and 24-well plates at 100,000 and 20,000 cells per well respectively. After 20 hours, cells were transfected with double-stranded RNA-DNA hybrids at a final concentration of 200nM annealed oligo using Oligofectanime (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 45h of transfection, cells were placed in experimental conditions for 24 hours, followed by evaluation of apoptosis with fluorescence microscopy or evaluation of Bim-EL protein levels by western blotting. Oligonucleotides were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Bim-EL sense was 5'-(GACCGAGAAGGUAGACAAUUG)d(TT)-3', Bim-EL antisense was 5'-(CAAUUGUCUACCUUCUCGGUC)d(TT)-3', control sense was 5'-(GGCUGUAAACUUACGUGUACUU)d(TT)-3', control anti-sense was 5'-(AAGUACACGUAAGUUACAGCC)d(TT)-3' as previously reported (Reginato et al., 2003).

### ***ELISA for estimation of secreted collagen type I levels and active TGF $\beta$ I levels***

**Collagen type I:** One hundred  $\mu$ L of samples were pre-incubated overnight at 37°C on a 96-well plate with an anti-type I collagen 1 $\mu$ g/mL (Biodesign International, Saco, ME) diluted in PBS/BSA 1%. A secondary 96-well polystyrene plate was coated with 100 $\mu$ L of purified collagen type I 5 $\mu$ g/mL (Biodesign International, Saco, ME) diluted in 20mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH=9.6 for 2 hours at room temperature and then overnight at 4°C. The next day, the coated plate

was washed three times with PBS/Tween-20 0.05% and blocked with 200uL of PBS/BSA 1% for 2 hours. The pre-incubated samples were added to the coated plate for 1 hour at room temperature. The plate was washed three times followed by the addition of the peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, Biosource Int., Camarillo, CA) at a dilution of 1:20000 in PBS/BSA 1% for 90 minutes at room temperature. The peroxidase substrate (0.003%  $H_2O_2$ , 0.4 mg/mL o-phenyleno-diamine in 0.1M citrate buffer pH=6) was added after three washes and the plate was kept in the dark for 30 min. The reaction was stopped by adding 2M  $H_2SO_4$  (50uL/well) and the absorbance was measured at 490nm. The concentration of collagen type I was estimated using reference samples of purified collagen type I.

**TGF- $\beta$ 1:** Levels of active TGF- $\beta$ 1 were measured using a commercially available active-TGF- $\beta$ 1 Immunoassay Kit (Biosource Int., Camarillo, CA) according to the protocol provided by the manufacturer.

**Reagents.** LY294002 and chondroitin 4-sulfate were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). ZVAD-FMK was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The peptide homologous to the protein core of the C-terminal fragment of perlecan isolated in medium conditioned by apoptotic EC (CQLREPCLHGGTCQGTRCLCLPGFSGPRCQQGSGHG) was synthesised at the Biotechnology Research Institute of Canada (Montreal, Canada). All other reagents were from Sigma Chemicals (Oakville, ON, Canada).

***Statistical analysis.*** Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analysed using Student's T-test or ANOVA, as appropriate. A  $P < 0.05$  was considered significant for all tests.

## Acknowledgements

This work was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant # MT-15447) and the Kidney Foundation of Canada to MJH. MJH is a scholar of the CIHR. We thank the Fondation J. L. Lévesques and the Fondation CHUM for their support. We thank Dr. Tomoko Takano and Dr. Richard Bertrand for helpful advice.



**Abbreviations**

EC : Endothelial cell

PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase

ECM : Extra-cellular matrix

$\alpha$ SMA : Alpha smooth muscle actin

HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell

N : Normal medium

SS : Serum-free medium

SSC : Serum-free medium conditioned by apoptotic endothelial cells

CS : Chondroitin 4-sulfate

Pep : Synthetic peptide homologous to amino acids 4147-4182 of perlecan

## References

- Auger, F.A., C.A. Lopez-Valle, R. Guignard, N. Tremblay, B. Noël, F. Goulet, and L. Germain. 1995. Skin equivalents produced by tissue-engineering using human collagen. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31:432-439.
- Bordon, A., M. Dueymes, Y. Levy, C. Jamin, J.P. Leroy, J.C. Piette, Y. Shoenfeld, and P.Y. Youinou. 1998. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest.* 101:2029-2035.
- D'Cruz, D. 2000. Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol Lett.* 112-113:421-32.
- Desmoulières, A., M. Redard, I. Darby, and G. Gabbiani. 1996. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 146:56-66.
- Frisch, S.M., and R.A. Screaton. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Op Cell Biol.* 13:555-562.
- Gabbiani, G. 1998. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res.* 38:545-548.
- Hébert, M.J., S.R. Gullans, H.S. Mackenzie, and H.R. Brady. 1998. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an IL-1B dependent paracrine loop. *Am J Pathol.* 152:523-32.
- Hébert, M.J., T. Takano, H. Holthofer, and H.R. Brady. 1996. Sequential morphological events during apoptosis of human neutrophils. *J Immunol.* 157:3105-15.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-776.

- Iozzo, R.V., and J.D. San Antonio. 2001. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest.* 108:349-55.
- Jelaska, A., and J.H. Korn. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 43:2230-2239.
- Jun, J.B., M. Keuchle, J.M. Harlan, and K.B. Elkon. 2003. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 15:756-760.
- Kalluri, R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 3:422-433.
- McCawley, L.J., and L.M. Matrisian. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr Op Cell Biol.* 13:534-540.
- Meier, P., A. Finch, and G. Evan. 2000. Apoptosis in development. *Nature.* 407:796-801.
- Raymond, M., A. Désormeaux, P. Laplante, N. Vigneault, J. Filep, K. Landry, A. Pshezhetsky, and M. Hébert. 2004. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 18:705-707 doi:10.1096/fj.03-0573fje.
- Raymond, M., L. Mollica, N. Vigneault, A. Desormeaux, J. Chan, J. Filep, and M. Hébert. 2003. Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB J.* 17:515-7.
- Raymond, M.A., N. Vigneault, V. Luyckx, and M.J. Hébert. 2002. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 291:261-9.

- Reginato, M.J., K.R. Mills, J.K. Paulus, D.K. Lynch, D.C. Sgroi, J. Debnath, S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol.* 5:733-740.
- Santiago, B., M. Galindo, M. Rivero, and J. Pablos. 2001. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 44:1667-76.
- Scaffidi, A., Y. Moodley, M. Weichselbaum, P. Thompson, and D. Knight. 2001. Regulation of human lung fibroblast phenotype and function by vitronectin and vitronectin integrins. *J Cell Sci.* 114:3507-16.
- Sgonc, R., M.S. Gruschwitz, H. Dietrich, H. Recheis, M.E. Gershwin, and G. Wick. 1996. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest.* 98:785-792.
- Shi, Y., J.J. O'Brien, A. Fard, and A. Zalewski. 1996. Transforming growth factor-beta 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16:1298-305.
- Thannickal, V., D. Lee, E. White, Z. Cui, J. Larios, R. Chacon, J. Horowitz, R. Day, and P. Thomas. 2003. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 278:12384-9.
- Tomasek, J.J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R.A. Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 3:349-363.

Vaughan, M.B., E.W. Howard, and J.J. Tomasek. 2000. Transforming growth factor-B1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 257:180-189.

Worda, M., R. Sgonc, H. Dietrich, H. Niederegger, R. Sundick, M. Gershwin, and G. Wick. 2003. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum.* 48:2605-14.

## Figure Legends

**Figure 1.** Mediators produced by apoptotic EC induce resistance to apoptosis in human fibroblasts. **A.** Top Left panel. Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to normal medium (N), serum-free medium (SS) and serum-free medium conditioned by apoptotic HUVEC (SSC), \* $p < 0.03$  vs N, representative of 25 experiments. Top Right panel. Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to N, SS and SSC, \* $p < 0.0002$  vs N, representative of 8 experiments. Lower panel. Representative micrographs of WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS and SSC, followed by staining with Hoechst 33342 (HT) and propidium iodide (PI). Arrows point to apoptotic cells (Magnification 200X). Bar, 20 $\mu$ m. **B.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS and SSC, either alone or with bleomycin 5 $\mu$ g/mL (Bleo), \* $p < 0.04$  vs N, & $p < 0.02$  vs SS and SSC+Bleo 5 $\mu$ g/mL, representative of 9 experiments. **C.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to SS, SSC, medium conditioned by apoptotic HUVEC pre-incubated with DMSO (SSC-DMSO) or medium conditioned by HUVEC in which apoptosis was inhibited (SSC-ZVAD). \* $p < 0.0003$  vs SSC and SSC-DMSO, representative of 10 experiments.

**Figure 2.** Molecular regulation of resistance to apoptosis in fibroblasts induced by mediators produced by apoptotic EC. **A.** Immunoblotting analysis. Presence of phosphorylated Akt (Ser473) in WI-38 fibroblasts exposed to SSC for 1 hour and 4 hours, as compared with N and SS. These results are representative of 3

independent experiments. **B.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS or SSC, either alone, with an inhibitor of PI3K (LY294002 5uM) or vehicle (DMSO). \* $p < 0.05$  vs N, & $p < 0.008$  vs SSC and SSC-DMSO, representative of 9 experiments. **C.** Immunoblotting analysis. Increased protein levels of Bim-EL in WI-38 fibroblasts exposed to SS and SSC in presence of LY294002 (5uM) for 24 hours, as compared with N, SSC alone and the vehicle (DMSO). These results are representative of 4 independent experiments. Two sections from the same gel (with corresponding alpha-tubulin) are shown. **D.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts transfected with Bim-EL siRNA or control before exposure to N, SS and SSC for 24 hours, \* $p < 0.02$  vs N, & $p < 0.03$  vs control siRNA and vehicle (Oligofectamine), representative of 6 experiments. **E.** Immunoblotting analysis. Decreased protein levels of Bim-EL in WI-38 fibroblasts exposed to SS+Bim-EL siRNA as compared with SS+Oligofectamine and SS+control siRNA. These results are representative of 5 independent experiments. **F.** Immunoblotting analysis. Increased protein levels of the anti-apoptotic molecule Bcl-Xl in WI-38 fibroblasts exposed to SSC for 4 and 7 days, as compared with N and SS. These results are representative of 12 independent experiments. **G.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to N, SS or SSC, either alone, with LY294002 (5uM) or vehicle (DMSO). \* $p < 0.0001$  vs N, & $p < 0.002$  vs SSC and SSC-DMSO, representative of 8 experiments. **H.** Immunoblotting analysis. Decreased protein levels of Bcl-Xl in WI-38 fibroblasts exposed to SSC concomitantly with LY294002 (5uM) for 7 days, as compared with vehicle (DMSO) and SSC alone.

These results are representative of 3 independent experiments. Two sections from the same gel (with corresponding alpha-tubulin) are shown.

**Figure 3.** Regulation of apoptosis of fibroblasts by motifs present on the domain V of perlecan. **A.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS, SSC and serum-free medium supplemented with either chondroitin-4-sulfate (CS 30-60-125-250 ug/mL) or with a synthetic peptide homologous to amino acids 4147-4182 of perlecan (Pep 0.01-0.1-1 ug/mL), \* $p < 0.03$  vs N, representative of 7 experiments. **B.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS, SSC serum-free medium supplemented with chondroitin-4-sulfate (CS 125ug/mL) or with the synthetic peptide (Pep 100ng/mL), either alone, with LY294002 (5uM) or vehicle (DMSO), \* $p < 0.05$  vs N, & $p < 0.008$  vs SSC and SSC-DMSO,  $^{\epsilon}p < 0.02$  vs CS 125ug/mL and CS+DMSO,  $^{\text{f}}p < 0.001$  vs Pep 100ng/mL and Pep+DMSO, representative of 7 experiments. **C.** Immunoblotting analysis. Bim-EL protein levels are decreased in WI-38 fibroblasts exposed to N, SSC, CS 60-125ug/mL and Pep 0.1-1ug/mL for 24 hours, as compared with SS. These results are representative of 7 independent experiments. **D.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to N, SS, SSC, CS 125ug/mL and Pep 100ng/mL, \* $p < 0.0001$  vs N, representative of 7 experiments. **E.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to N, SS, SSC serum-free medium supplemented with chondroitin 4-sulfate (CS 125ug/mL) or with synthetic peptide (Pep 100ng/mL), either alone, with LY294002 (5uM) or vehicle (DMSO), \* $p < 0.04$  vs N, & $p < 0.002$  vs SSC and SSC-DMSO,  $^{\text{f}}p < 0.04$  vs CS 125ug/mL and CS+DMSO,



representative of 7 experiments. **F. Immunoblotting analysis.** Increased protein levels of Bcl-Xl in WI-38 fibroblasts exposed to SSC and CS 125 ug/mL for 7 days, as compared with N and SS. Serum-free medium supplemented with Pep 100 ng/mL failed to increase Bcl-Xl protein levels in WI-38 fibroblasts treated for 7 days. These results are representative of 5 independent experiments. Three images from two different gels (with corresponding alpha-tubulin) are shown.

**Figure 4.** Endothelial apoptosis induces myofibroblast differentiation of human fibroblasts. **A. Immunoblotting analysis.** Upper panel. Increased protein level of  $\alpha$ SMA in WI-38 fibroblasts exposed to SSC for 7 days, as compared with both N and SS. Lower panel. Increased protein level of desmin in WI-38 fibroblasts exposed to SSC for 7 days, as compared with both N and SS. These results are respectively representative of 10 and 6 independent experiments. **B. ELISA analysis.** Increased secretion of collagen type I by WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SSC, as compared with fibroblasts exposed to SS. \* $p < 0.009$  vs SS, representative of 9 experiments. **C.** Increased FITC staining for  $\alpha$ SMA in WI38 fibroblasts exposed for 7 days to SSC, as compared with N and SS. Actin filaments were visualised using fluorescence microscopy (magnification 400X). TGF- $\beta$ 1 (2ng/mL) is shown as a positive control of myofibroblast differentiation. Micrographs are representative of 3 independent experiments. Bar, 10 $\mu$ m. **D.** Rhodamine-phalloidin staining for stress fibers in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SSC, as compared with N and SS. Stress fibers were visualized using fluorescence microscopy (magnification 400X). TGF- $\beta$ 1 (2ng/mL) is shown as a positive control of myofibroblast differentiation. Micrographs are representative

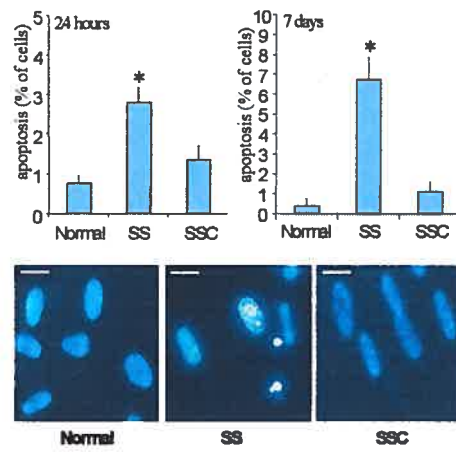
of 2 independent experiments. Bar, 10 $\mu$ m. **E.** Immunoblotting analysis. Increased protein levels of  $\alpha$ -SMA in WI-38 fibroblasts exposed to SSC, CS 125ug/mL and Pep 100ng/mL for 7 days, as compared with both N and SS. Decreased protein levels of  $\alpha$ -SMA in WI-38 fibroblasts exposed to SSC, CS (125ug/mL) and Pep (100ng/mL) in presence of LY294002 (5uM) for 7 days, as compared with vehicle (DMSO). These results are representative of 6 independent experiments. Three images from two different gels (with corresponding alpha-tubulin) are shown.

**Figure 5.** Systemic sclerosis fibroblasts are more sensitive to mediators produced by apoptotic EC than normal fibroblasts. **A.** Percentage of apoptotic cells in skin fibroblasts derived from normal adult human controls (#1, #2, #3) exposed for 24 hours to N, SS, SSC and serum-free medium supplemented with either chondroitin 4-sulfate (CS 60-125-500 ug/mL) or with the synthetic peptide (Pep 0.1-1-10-100 ug/mL). Upper left panel: \* $p < 0.02$  vs N, representative of 3 experiments. Upper right panel: \* $p < 0.03$  vs N, representative of 5 experiments. Lower panel: \* $p < 0.03$  vs N, representative of 3 experiments **B.** Percentage of apoptotic cells in fibroblasts derived from fibrotic skin of sclerodermic patients exposed for 24 hours to N, SS, SSC and serum-free medium supplemented with either chondroitin 4-sulfate (CS 60 or/and 125 ug/mL) or with the synthetic peptide (Pep 0.1 or/and 1 ug/mL). Upper left panel: \* $p < 0.03$  vs N, representative of 3 experiments. Upper right panel: \* $p < 0.03$  vs N, representative of 6 experiments. Lower left panel: \* $p < 0.05$  vs N, representative of 6 experiments. Lower right panel : \* $p < 0.02$  vs N, representative of 4 experiments.

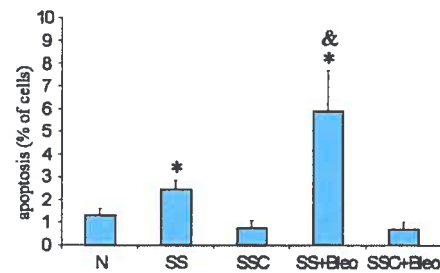
**Figure 6.** Schematic diagram of events leading to fibrosis after endothelial damage. Apoptosis of EC triggers the release of soluble mediators which include a C-terminal fragment of perlecan. This, in turn, activates PI3K in fibroblasts leading to resistance to apoptosis, sequentially regulated by the modulation of Bim-EL and Bcl-Xl protein levels, and to myofibroblast differentiation. Chronic production of these mediators, however, could lead to fibrosis.

Figure 1

A.



B.



C.

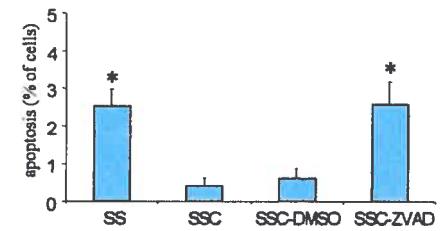


Figure 2

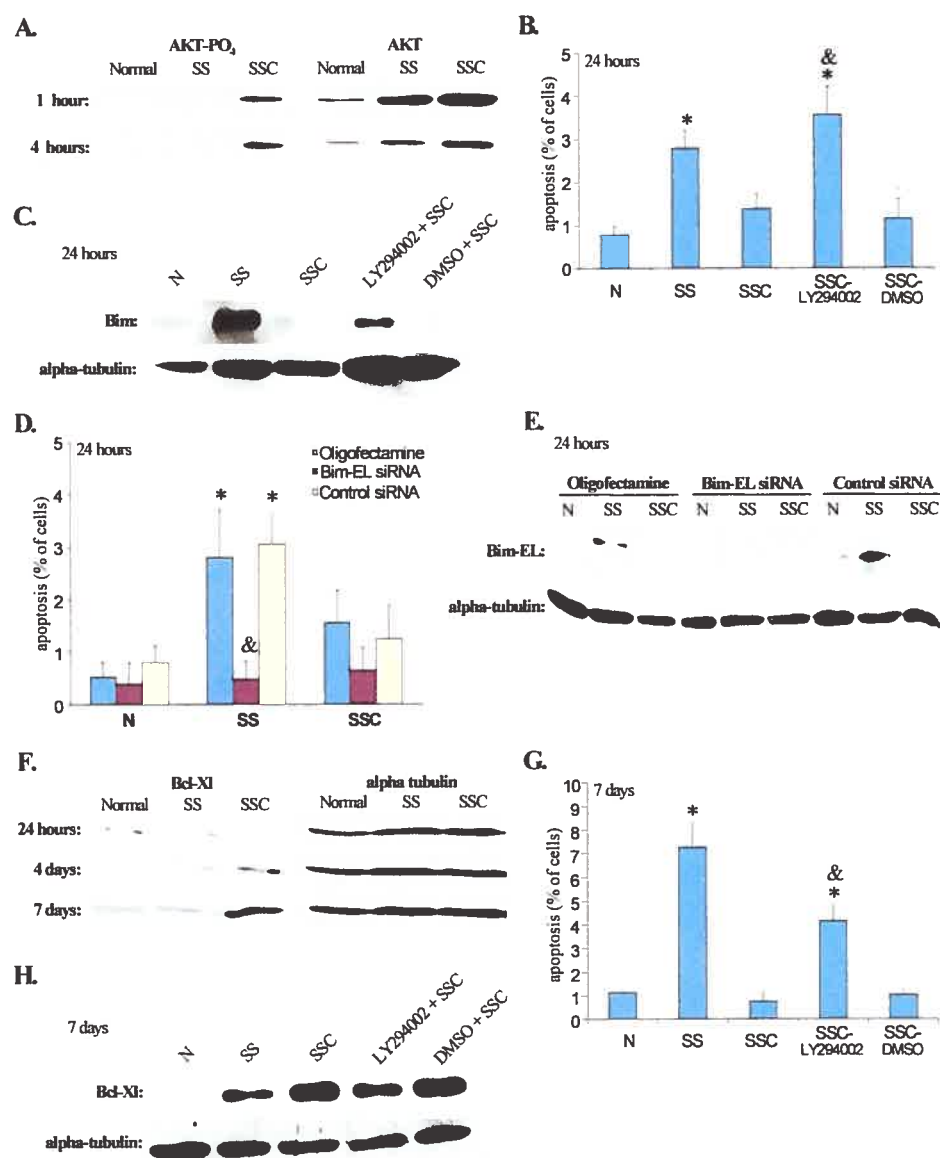
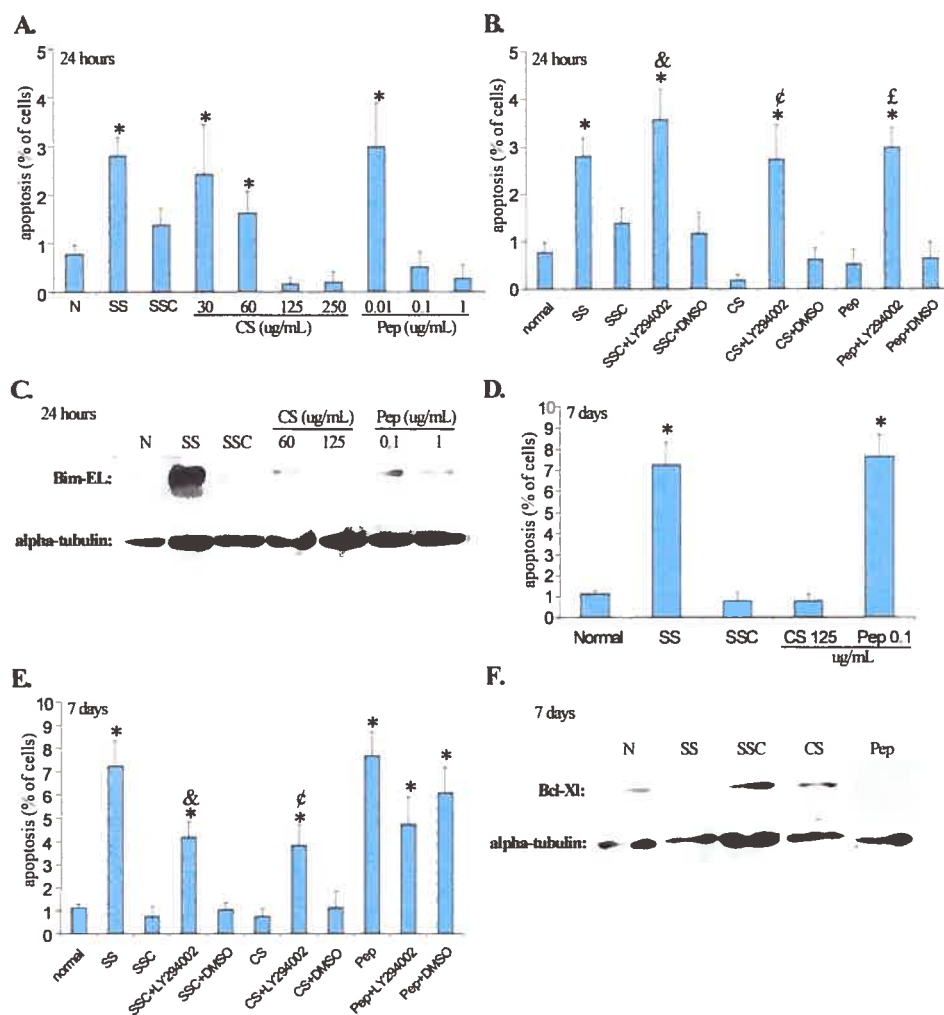


Figure 3



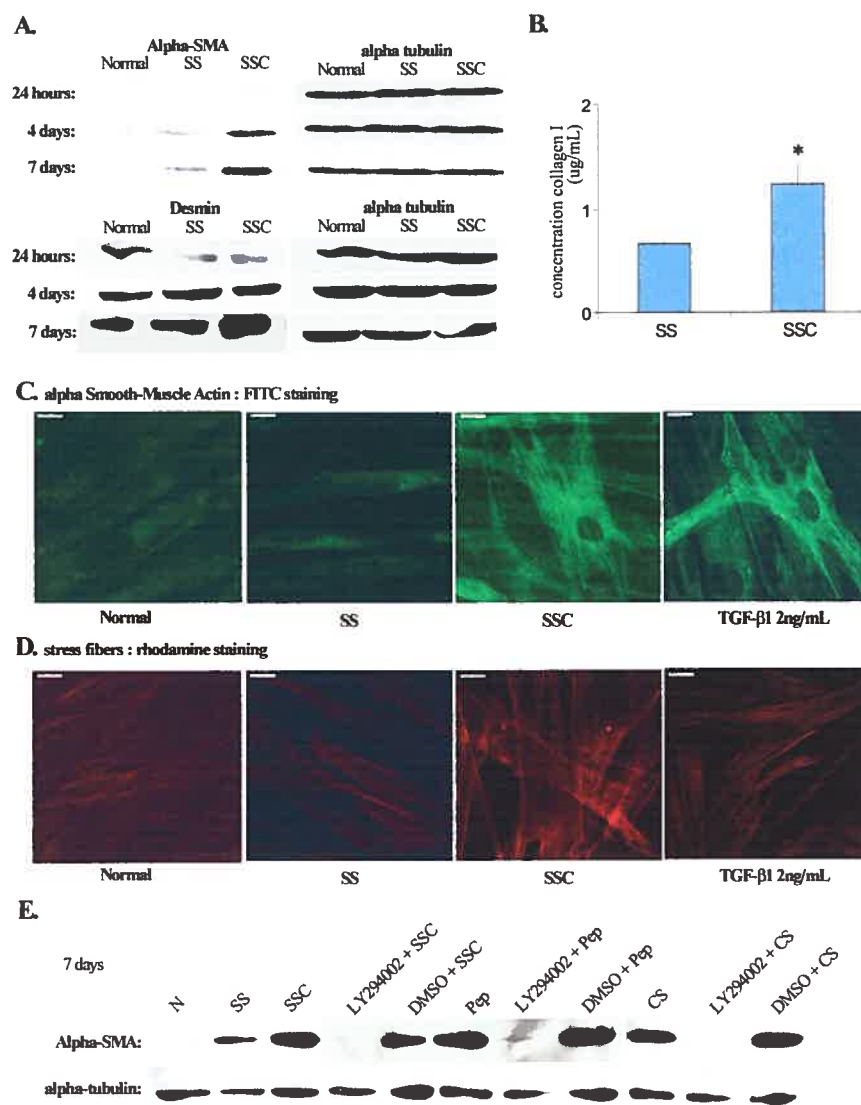


Figure 5

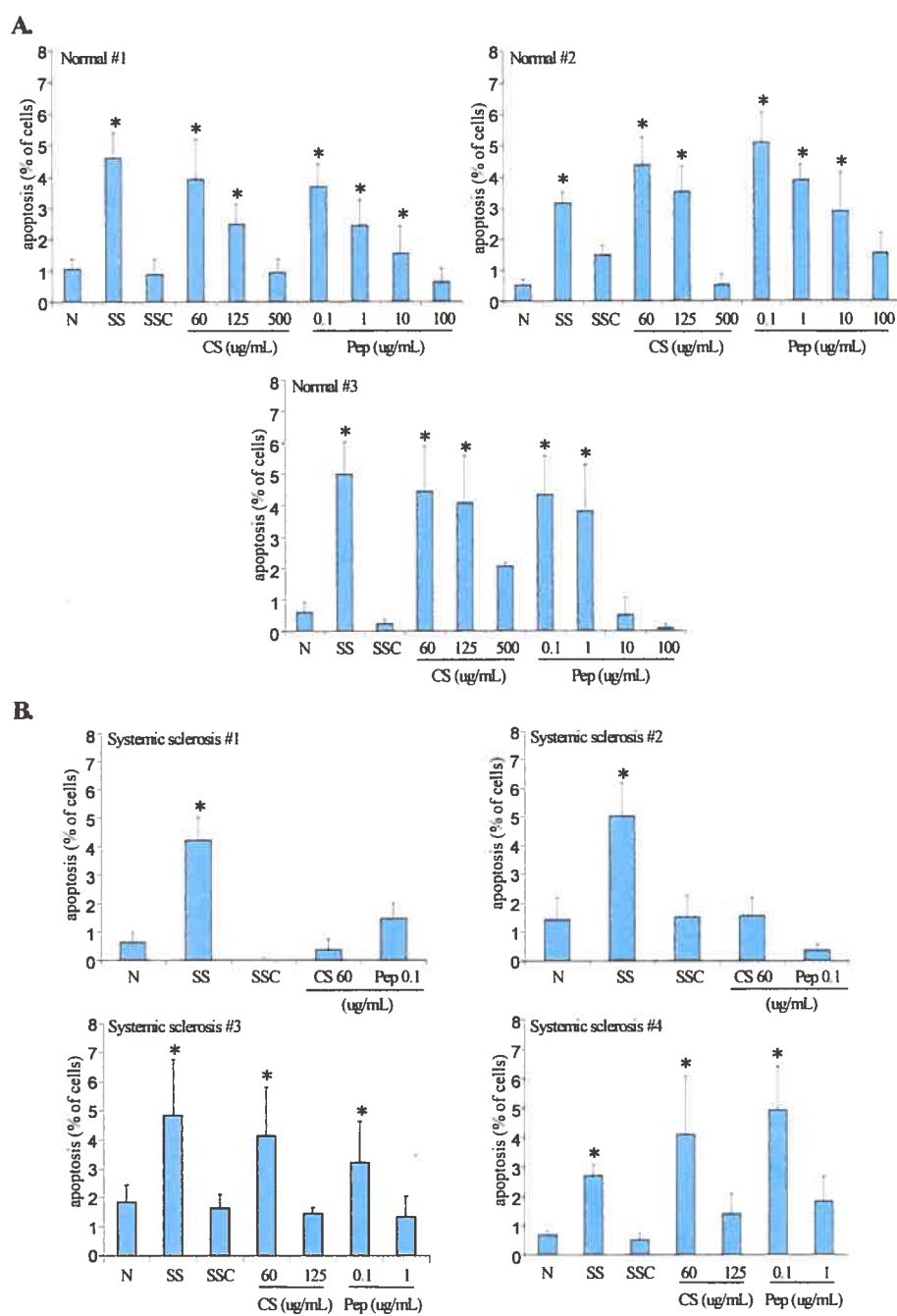
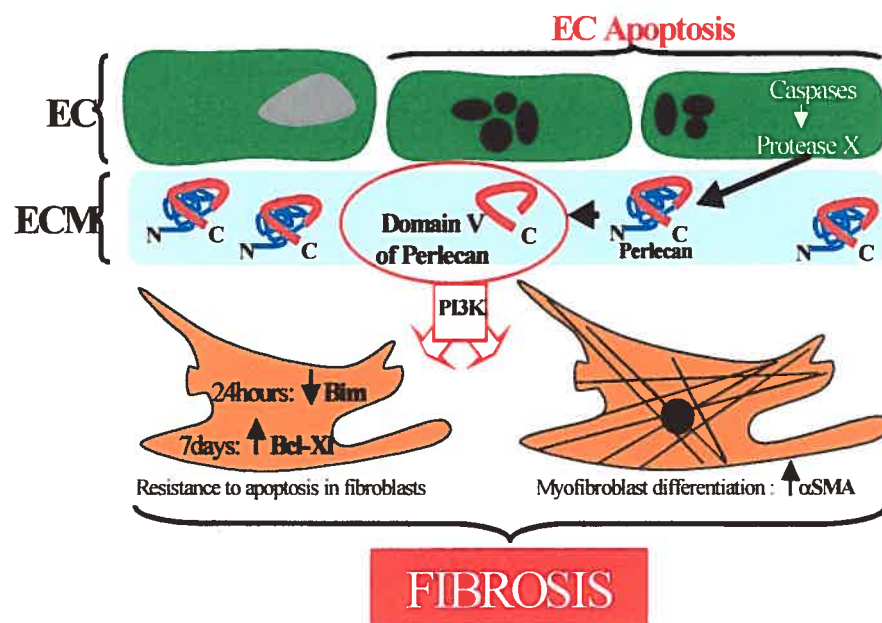




Figure 6



#### 4. DISCUSSION

D'un point de vue fonctionnel, la cellule possède une grande capacité à s'adapter aux changements environnementaux, ce qui fait de cette entité un outil indispensable à l'exécution des divers processus biologiques essentiels au maintien d'un être vivant. Les différents types de cellules qui nous composent assurent l'homéostasie de nos tissus par leur nombre, leur composition, leur localisation géographique et leur fonction intrinsèque respective (6). À cet effet, le nombre de cellules qui composent nos tissus est sévèrement contrôlé chez l'organisme par des mécanismes de division, de migration et de mort cellulaire (1).

Depuis la seconde moitié du 19<sup>e</sup> siècle, plusieurs recherches effectuées sur le développement animal ont soulevé l'existence possible de mécanismes régulant une mort physiologique des cellules, voire régulée génétiquement (264, 265). Cependant, ce n'est que depuis la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle que l'existence d'un programme d'auto-destruction cellulaire est reconnue et caractérisée. Aujourd'hui, le phénotype le plus caractérisé de cette mort cellulaire programmée est l'apoptose, une forme de suicide cellulaire jouant un rôle essentiel au niveau de l'identité génétique et l'intégrité de l'organisme en induisant rapidement l'élimination des cellules non désirées (2). Des dysfonctions au niveau des mécanismes régulant ces processus de mort apoptotique peuvent donc être la source de plusieurs pathologies où l'intégrité du tissu atteint est compromise, soit par un manque ou un surplus de cellules (2). À l'opposé de la mort cellulaire, la survie des cellules joue aussi un rôle important sur l'homéostasie tissulaire. Ces deux antipodes contrôlant le destin des cellules doivent être hautement régulés au niveau moléculaire de façon à répondre efficacement aux signaux provenant à la

fois de l'extérieur et de l'intérieur de la cellule. L'élucidation des divers mécanismes d'action contrôlant ces processus représente donc un centre d'intérêt important pour la recherche portant sur l'induction et l'inhibition de la mort cellulaire.

L'apoptose a longtemps été considérée comme un mécanisme de mort cellulaire programmée permettant un retrait silencieux d'une cellule à son environnement empêchant du même coup le développement d'une réponse inflammatoire. À cet effet, beaucoup de recherches ont été concentrées sur les mécanismes intracellulaires régulant l'apoptose, mais peu se sont intéressées aux répercussions paracrine de cette mort cellulaire programmée sur son environnement local. De récentes données générées au laboratoire du Dre Hébert suggèrent maintenant que l'apoptose des cellules endothéliales (CE) mène à l'activation de voies paracrine de réparation régulant l'apoptose et la prolifération des cellules avoisinantes (266, 267). Par ailleurs, avec les résultats présentés dans cet ouvrage, on peut maintenant affirmer que des voies paracrine de différenciation cellulaire sont aussi activées suite à ce suicide cellulaire. Ces études avaient pour objectif de mieux définir les mécanismes de réparation activés suite à une atteinte endothéliale. Ainsi l'apoptose des CE a pu être reliée aux diverses réactions des cellules avoisinantes de la paroi vasculaire dont les CE elles-mêmes, les cellules musculaires lisses (CML) et les fibroblastes.

L'atteinte endothéliale est à l'origine de plusieurs pathologies à composantes fibrotiques issues des mécanismes de réparation infructueux activés suite à

l'apoptose des CE. La sclérose systémique (SSc), la microangiopathie thrombotique (MT) et l'athérosclérose en sont des exemples. Pour l'ensemble, le développement de la maladie se caractérise par une réponse fibroproliférative chez les CML et les fibroblastes menant à une production excessive d'éléments de la MEC et subséquemment à la fibrose (136). En situation normale, l'insulte endothéliale ne constitue pas un facteur pathologique, mais bien un élément initiateur dans les processus de réparation normaux menant à la guérison du tissu endommagé. Cependant, nous pouvons maintenant penser que la chronicité de l'insulte au niveau de l'endothélium peut engendrer un remodelage excessif, voire perpétuel de son environnement causant ainsi des désordres fibrotiques au niveau du tissu en réparation. Cette réponse fibrotique exagérée et source de pathologies survient en association avec l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes et par une différenciation persistante de fibroblastes en myofibroblastes (112), soient deux caractéristiques à l'étude dans cet ouvrage. Les relations exactes entre l'insulte endothéliale et le développement de la fibrose sont encore aujourd'hui méconnues dans la littérature, mais chose certaine, cette relation de cause à effet semble être prédominante pour plusieurs pathologies. Ceci nous a poussé à poser des hypothèses de recherche portant sur l'importance de la réponse paracrine de l'apoptose endothéliale sur son environnement vasculaire local, soit les CE elles-mêmes, les CML et les fibroblastes.

Pour parvenir à tester nos hypothèses, nous avons développé un système expérimental *in vitro* où des HUVEC ont été soumises à un stress pro-apoptotique (pour tenter de mimer l'insulte endothéliale) qui consiste en une exposition à du

milieu sans-sérum et ce, pour une période de quatre heures. Il y a alors apoptose des CE et relâche de médiateurs solubles dans le milieu sans-sérum qui devient alors du milieu sans-sérum conditionné (SSC). Celui-ci est alors utilisé pour traiter les CE, les CML et les fibroblastes de façon à étudier la réponse paracrine de l'apoptose endothéliale sur son environnement. Dans notre système, la carence en sérum est utilisée pour induire l'apoptose des CE pour trois principales raisons : la première étant que la carence en sérum représente un inducteur classique de l'apoptose, la deuxième étant que notre système présente beaucoup de similitudes avec plusieurs stimuli pro-apoptiques fréquemment rencontrés *in vivo* comme l'hypoxie et les stress génotoxiques, tous étant connus pour induire une apoptose p53 dépendante et la troisième étant que le milieu conditionné par des CE soumises au stress pro-apoptotique qu'est la carence en sérum ne contient que les facteurs issus des CE. En fait, la carence en sérum nous permet de générer un milieu SSC sans les facteurs de croissance normalement présents dans un milieu normal complet avec sérum. Les effets du SSC peuvent donc être attribués aux médiateurs issus des CE. C'est donc pour toutes ces raisons que le milieu SSC a été utilisé pour les recherches subséquentes.

Notre groupe s'est donc intéressé aux répercussions de l'apoptose endothéliale sur son environnement. Dans un premier temps, le milieu conditionné par des cellules endothéliales soumises à un stress pro-apoptotique (SSC) favorise la viabilité des CE et ce, par une activité autocrine anti-apoptotique, pro-proliférative et pro-angiogénique (266). L'effet anti-apoptotique chez les CE a été caractérisé au niveau moléculaire par une diminution de la relâche cytosolique du cytochrome

c, par une diminution du facteur pro-apoptotique Bax et par une augmentation du facteur anti-apoptotique Bcl-2. L'ensemble de ces mécanismes semble être régit par l'activation de la PKC (« Protein Kinase C ») montrant donc l'importance potentielle d'une voie de signalisation qui pourrait être ultérieurement ciblée à des fins thérapeutiques. Dans un deuxième temps, notre groupe de recherche a évalué l'impact paracrin du SSC, donc de l'apoptose endothéliale, sur une autre composante de la paroi vasculaire : les CML. Nous avons découvert que l'exposition des CML au SSC favorise leur viabilité qui se définit par une augmentation des activités anti-apoptotiques et pro-prolifératives (267). Ces effets perçus chez les CML ont été caractérisés au niveau moléculaire et les résultats obtenus font un parallèle inouï avec les données recueillies précédemment *in vivo* par d'autres équipes de recherche (268-270). On retrouve donc, chez les CML exposées aux médiateurs issus des CE apoptotiques, une augmentation de l'expression de Bcl-Xl, une diminution de l'expression de p53 et une activation de la voie de signalisation des MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») ERK 1/2 (267). De plus, les résultats présentés dans ce mémoire quant au comportement des fibroblastes exposés au milieu SSC suggèrent un rôle important pour la voie PI3K/Akt dans l'établissement du phénotype anti-apoptotique et myofibroblastique. Les trois types cellulaires de la paroi vasculaire étudiés par notre laboratoire, soient les CE, les CML et les fibroblastes, utilisent donc trois voies de signalisation différentes (respectivement PKC, MAPK et PI3K) dans l'établissement de leur phénotype anti-apoptotique suite à l'exposition au milieu SSC. D'un point de vue pharmaceutique, ces résultats s'avèrent plus qu'intéressants du fait qu'il serait possible de réguler le comportement d'un type

cellulaire particulier sans affecter le comportement des autres types de cellules de la paroi vasculaire et ce, en utilisant des inhibiteurs spécifiques par exemple.

Le SSC contient donc des facteurs anti-apoptotiques à la fois actifs sur les CE et les CML. Plus précisément, notre groupe a démontré que l'apoptose endothéliale entraîne la libération de nouveaux médiateurs paracrins comprenant entre autres, un fragment C-terminal du domaine V du perlécan. Celui-ci, de par son domaine EGF et son site d'attachement à la sulfate de chondroïtine, a la propriété d'inhiber l'apoptose des CE et des CML (267). Ces résultats suggèrent que les répercussions induites par le milieu conditionné par des CE apoptotiques seraient mises en marche, dans un contexte physiologique, de façon à favoriser le remodelage vasculaire et donc la réparation du vaisseau endommagé tout en empêchant une dénudation de la paroi. En ce sens, l'organisme vivant subissant une atteinte endothéliale favorise la survie et la prolifération des cellules avoisinantes, ce qui lui procure un avantage considérable dans les processus de réparation. À cet effet, nous pensons que l'apoptose est un type de mort cellulaire propre et bien régulé, mais pas nécessairement silencieux tel que soutenu par la littérature au sens où il y aurait des répercussions de ce suicide sur son environnement. C'est donc avec tous ces résultats préliminaires que l'hypothèse suivante a été formulée et ensuite validée par le présent travail : l'apoptose des CE permet une libération paracrine de nouveaux médiateurs solubles favorisant dans un premier temps un état de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes et plus tardivement un phénomène de différenciation myofibroblastique.



Les fibroblastes sont une composante cellulaire importante de la paroi vasculaire en plus de se retrouver un peu partout à travers la MEC de nos différents organes et tissus. Au niveau vasculaire, ils assurent principalement un rôle de support, mais lorsqu'ils sont stimulés, par exemple suite à une insulte endothéliale, ils migrent au site d'insulte, prolifèrent, se différencient et produisent une grande concentration de MEC collagénueuse de façon à isoler et réparer le tissu endommagé (103, 177). Par ailleurs, leur capacité à ne pas mourir et à engendrer le développement de la fibrose dans des contextes athérosclérotiques ou sclérodermiques font du fibroblaste une cible potentielle dans la guérison de ces maladies (119, 166). Puisque l'apoptose endothéliale a souvent été répertoriée comme un élément initial dans le développement de ces pathologies fibrotiques, nos résultats présentés dans ce travail deviennent importants au sens où ils permettent une meilleure compréhension des mécanismes menant à l'activation du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste.

Avec l'aide de notre milieu SSC, nous avons exposé les fibroblastes de type WI-38 aux médiateurs issus de cellules endothéliales soumises à un stress pro-apoptotique et ce, pour diverses périodes de temps. Par ces expériences, nous avons montré que le milieu SSC est en mesure d'induire un état de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes qui en sont exposés et ce, pour des périodes de temps allant de 24 heures à 7 jours. Nous avons ensuite voulu évaluer si les facteurs paracrins anti-apoptotiques étaient relâchés par des cellules endothéliales exclusivement en association avec l'apoptose. Pour ce faire, des CE ont préalablement été incubées en présence d'un inhibiteur pan-caspase, le zVAD-fmk

à des concentrations connues pour bloquer l'apoptose (271, 272). L'inhibition de l'apoptose chez les CE durant le conditionnement diminue significativement l'activité anti-apoptotique normalement retrouvée avec le milieu SSC sur les fibroblastes. Ces résultats nous montrent donc que l'inhibition de l'apoptose chez les CE avec le zVAD-fmk prévient la relâche de facteurs anti-apoptotiques actifs sur les fibroblastes. Voilà qui peut s'avérer une piste intéressante : l'apoptose caspase dépendante des CE pourrait être la source des facteurs pro-fibrotiques. À cet effet, l'inhibition des caspases chez les CE permettrait d'empêcher la relâche de ces facteurs ce qui éviterait le développement d'un phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste, phénotype associé à diverses pathologies comme la MT et la SSc (166, 273). Dans un esprit un peu plus compétitif, nous avons aussi démontré que les facteurs relâchés par des CE apoptotiques (milieu SSC) sont aussi en mesure d'inhiber, chez les fibroblastes, l'effet d'un autre stress pro-apoptotique que la carence en sérum, soit la bléomycine. Cet agent génotoxique est associé dans la littérature avec le développement de la SSc et de la fibrose pulmonaire chez différents modèles animaux dont l'homme (274). Il est connu que la bléomycine est en mesure d'induire l'apoptose des CE d'une façon dose dépendante en plus d'être responsable de la réponse fibrotique subséquente (275, 276). Nos résultats suggèrent donc que si une apoptose caspase dépendante est induite par la bléomycine au niveau des CE, il y aura production et relâche de médiateurs paracrins anti-apoptotiques empêchant du coup l'apoptose des fibroblastes et permettant le développement d'activités fibrogéniques.

L'effet de résistance à l'apoptose induit par le SSC chez le fibroblaste a aussi été caractérisé au niveau moléculaire. En effet, à court terme nous avons montré une inhibition de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim chez les fibroblastes exposés au SSC pour une période de 24 heures. À long terme, nous avons noté une augmentation progressive de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-Xl pour une période d'exposition des fibroblastes au SSC de 4 à 7 jours. Ces deux membres de la famille des Bcl-2 jouent un rôle important au niveau de la relâche du cytochrome c de la mitochondrie et de la cascade des caspases qui en découle. De son côté, Bim est un membre BH3-seul de la famille des Bcl-2 qui possède un domaine trans-membranaire et qui a déjà été répertoriée pour son rôle dans l'anoïkis (49, 257). L'isoforme EL de Bim, celle détectée avec nos immunobuvardages, est souvent liée au cytosquelette dans sa forme inactive, mais lorsque le stimulus apoptotique est présent, elle se dissocie et migre à la mitochondrie pour inactiver des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (50). Comme notre milieu SSC permet à la fois d'induire un effet de résistance à l'apoptose et une diminution de l'expression de Bim chez les fibroblastes, on pouvait facilement imaginer une relation de cause à effet, mais il restait à le prouver. Nous y sommes parvenus en utilisant la technologie du siRNA (Short Interfering RNA) qui consiste, brièvement, à inhiber la traduction de l'ARNm cible de par la liaison d'un bout d'ARN complémentaire qui entraînera subséquemment le recrutement d'un complexe de dégradation (277). Les fibroblastes transfectés avec le siRNA ciblé contre Bim-EL et soumis pour une période de 24 heures à la carence en sérum (stress pro-apoptotique) présentent à la fois un phénotype anti-apoptotique et une diminution de l'expression de Bim.

C'est donc dire que l'inhibition de Bim chez les fibroblastes exposés aux médiateurs relâchés par des cellules endothéliales apoptotiques est en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique. Pour ce qui est de Bcl-Xl et de son effet anti-apoptotique tardif (7 jours) sur les fibroblastes, nous n'avons pas été en mesure d'effectuer ce genre d'expérience et d'associer l'augmentation de l'expression de cette protéine avec le développement de la résistance à l'apoptose. Cependant, c'est une expérience qui sera tentée dans un avenir rapproché, mais nous pouvons tout de même remarquer aujourd'hui une étroite relation entre les deux événements. Bcl-Xl est grandement connue dans la littérature comme un membre important de la famille anti-apoptotique des Bcl-2 agissant sur la sortie du cytochrome c et du facteur AIF de la mitochondrie (278-281). Bcl-Xl a par ailleurs été répertoriée pour son rôle protecteur contre l'apoptose des fibroblastes induite par la bléomycine (39) et pourrait s'avérer un facteur important dans notre système expérimental. Nos résultats suggèrent donc que Bim et Bcl-Xl participent à l'acquisition de l'état de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes suite à une exposition aux médiateurs relâchés par des cellules endothéliales apoptotiques.

Nous avons ensuite caractérisé les voies de signalisation activées au cours de ces processus de résistance à l'apoptose développés chez les fibroblastes exposés aux médiateurs issus de CE apoptotiques. Quelques expériences préliminaires portant sur la viabilité des fibroblastes exposés à différents inhibiteurs chimiques spécifiques nous ont permis de cibler la voie des PI3K comme potentiellement importante dans le comportement du fibroblaste en réponse au SSC. Ensuite, après avoir remarqué que les fibroblastes exposés au milieu SSC avait une activité

PI3K précoce importante (de par les niveaux augmentés de phosphorylation de son principal substrat : Akt), nous avons relié la voie PI3K/Akt à l'induction du phénotype anti-apoptotique par le SSC chez le fibroblaste. À court terme (24 heures), l'utilisation de LY294002, un inhibiteur de l'activité PI3K, permet à la fois de réduire l'activité anti-apoptotique du SSC tout en rétablissant l'expression de Bim tandis qu'à long terme (7 jours), l'utilisation de LY294002 permet à la fois de réduire l'activité anti-apoptotique du SSC tout en diminuant l'expression de Bcl-Xl. C'est donc dire que les facteurs relâchés par les CE apoptotiques induisent un état de résistance à l'apoptose PI3K dépendant chez les fibroblastes séquentiellement régulé par les protéines Bim et Bcl-Xl. Pour sa part, la voie de signalisation PI3K/Akt est connue dans la littérature pour être impliquée dans une multitude de mécanismes ayant à la fois des rôles dans la prolifération, le métabolisme et la survie de la cellule (136, 167, 259). À cet effet, le rôle de Akt dans les mécanismes de survie cellulaire est très bien connu dans la littérature ce qui corrobore donc bien avec les résultats présentés dans ce travail. C'est donc dire que la voie PI3K/Akt pourrait être ciblée pour de futures interventions pharmaceutiques de façon à régler certaines pathologies associées aux désordres apoptotiques comme la sclérodermie où l'activité de cette voie semble importante (136). Puisque l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes est une des caractéristiques du développement de la fibrose en SSc, la voie PI3K/Akt pourrait aussi être ciblée pour prévenir plusieurs pathologies à caractère fibrotique. Cependant, les effets de cette stratégie thérapeutique devront être préalablement considérés pour l'ensemble de l'être vivant visé où la majorité des cellules qui le composent utilise cette voie de signalisation.

Toujours dans l'optique où les médiateurs libérés par des CE apoptotiques sont en mesure d'induire une réponse pro-fibrotique sur leur environnement, nous avons montré que le milieu SSC est en mesure d'induire chez le fibroblaste des changements phénotypiques caractéristiques de la différenciation myofibroblastique. En effet, nous avons décelé une augmentation de l'expression protéique d'  $\alpha$ -SMA et de desmine en plus d'une augmentation de la formation de fibres de stress intracellulaires et d'une augmentation de la sécrétion de collagène de type I et ce, chez les fibroblastes exposés pour 7 jours au milieu conditionné par des CE apoptotiques. Comme il est connu que la voie PI3K/Akt joue aussi un rôle important dans les mécanismes de différenciation myofibroblastique (227, 282), entre autres via l'activation des intégrines et de la FAK, nous avons vérifié si le LY294002 était en mesure de bloquer le processus de différenciation induit par le SSC chez les fibroblastes. L'exposition de fibroblastes pour 7 jours au milieu SSC en présence de LY294002 bloque l'expression d'  $\alpha$ -SMA, un marqueur spécifique de la différenciation myofibroblastique (283). Ces derniers résultats suggèrent donc que les facteurs solubles présents dans le milieu SSC sont en mesure d'induire des mécanismes de différenciation myofibroblastique dépendants de la voie PI3K. Encore ici, la voie PI3K/Akt pourrait être ciblée pour empêcher les processus de différenciation myofibroblastique qui sont souvent caractéristiques de pathologies fibrotiques comme la SSc (284). On a par ailleurs démontré qu'au moins un des médiateurs présents dans le milieu SSC est un constituant de la MEC, soit un fragment du domaine V du perlécan. En extrapolant quelque peu, on peut s'imaginer que ce fragment de perlécan pourrait se lier à un récepteur de type intégrine au niveau du fibroblaste ce qui résultera en une activation subséquente de

la FAK, de la voie PI3K/Akt et de gènes caractéristiques au myofibroblaste. Tout cela reste cependant à confirmer, mais nos résultats pourraient appuyer ces processus de différenciation myofibroblastique intégrines dépendants. Davantage d'expériences devront être réalisées avant de parvenir à isoler des protéines cibles pouvant réguler le comportement du myofibroblaste dans notre système.

En regard avec l'ensemble de la littérature, il est pratiquement impossible de dissocier TGF-B1 et différenciation myofibroblastique. Comme nous avons caractérisé les médiateurs présents dans le milieu conditionné par des CE apoptotiques et n'avons pas retrouvé de TGF-B1 (266), nous présentons ici deux issues possibles quant aux rôles respectifs du milieu SSC et du TGF-B1 au niveau de la différenciation de nos fibroblastes. Nous pensons donc que les médiateurs solubles présents dans le milieu SSC sont soit en mesure d'induire un processus direct de différenciation myofibroblastique ou soit en mesure de favoriser une production autocrine de TGF-B1 chez le fibroblaste ce qui permettrait ensuite d'activer ou d'amplifier les processus de différenciation. Dans le but de résoudre cette énigme, nous avons dosé la quantité de TGF-B1 retrouvée dans le milieu SSC avant et après exposition aux fibroblastes pendant 7 jours pour se rendre compte que les fibroblastes étaient en mesure d'en sécréter quelque peu. Théoriquement, la concentration de TGF-B1 retrouvée dans le milieu SSC après exposition aux fibroblastes pour 7 jours n'est pas suffisante pour induire la différenciation myofibroblastique, mais nous oriente davantage sur notre deuxième hypothèse. En effet, cette concentration de TGF-B1, en collaboration avec les médiateurs présents dans le milieu SSC, serait nécessaire à l'accomplissement des

mécanismes de différenciation myofibroblastique. Nous sommes présentement en train d'éclaircir cette avenue avec l'utilisation de techniques d'immunodéplétion et d'anticorps neutralisant dirigées contre le TGF-B1. Ceci sera d'autant plus important puisque le TGF-B1 est aussi impliqué dans des mécanismes de survie PI3K/Akt dépendants chez plusieurs types cellulaires dont les fibroblastes (285, 286). Par ailleurs, une attention particulière sera portée aux autres isoformes du TGF-B, soient B2 et B3, qui sont aussi capables d'induire la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes *in vitro* (203).

Au cours de la réalisation de ce travail, d'autres expériences ont été et sont encore menées en parallèle dans le laboratoire de façon à caractériser biochimiquement les médiateurs solubles présents dans le milieu conditionné par des cellules endothéliales apoptotiques (SSC). Certains d'entre eux, jusqu'ici, sont capables d'induire un phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste et une différenciation myofibroblastique. Brièvement, le milieu SSC a été concentré et fractionné par FPLC (« Fast Protein Liquid Chromatography ») pour obtenir une fraction bioactive qui, mise sur gel, révéla une bande majeure alors absente des autres fractions inactives. L'analyse par spectrométrie de masse identifia la bande comme étant un fragment C-terminal du perlécan, un protéoglycan de la membrane basale (178). En fait, les fragments reliés au perlécan qui ont été caractérisés par cette technique font tous partie de l'extrémité C-terminale du domaine V du perlécan. Tel que mentionné dans l'introduction de ce travail, le domaine V du perlécan contient trois motifs homologues au domaine G de la laminine-1, quatre motifs d'homologie EGF et une sérine servant d'ancrage à la



sulfate de chondroïtine (CS) (287). En se fiant au poids moléculaire de la bande identifiée en spectrométrie de masse et à la localisation des fragments au niveau du perlécan, notre fragment de perlécan issu du milieu SSC devrait contenir un motif d'homologie EGF, un motif homologue au domaine G de la laminine-1 et la sérine servant d'ancrage à la CS. Dans une étude qui a récemment été publiée, notre laboratoire a démontré qu'un peptide synthétique de 36 a.a. (comprenant le motif EGF et la sérine d'ancrage à la CS) et la sulfate de chondroïtine elle-même, sont en mesure d'induire un effet de résistance à l'apoptose chez les CML (267). Par contre, le perlécan entier n'est pas en mesure d'induire ce genre de phénotype ce qui suggère que la protéolyse de son domaine V, en particulier comme les fragments identifiés dans notre milieu SSC, s'avère nécessaire pour son activité biologique. Le site exact de clivage du perlécan en N-terminal n'est pas encore défini. On sait cependant que l'apoptose caspase dépendante des cellules endothéliales est nécessaire à la relâche de facteurs anti-apoptotiques actifs à la fois chez les CML et les fibroblastes. Le perlécan ne possède pas de site de clivage connu pour les caspases ce qui suggère qu'une protéase, non identifiée à ce jour et placée en aval de l'activation des caspases, serait responsable de la protéolyse du domaine V.

En ce qui a trait plus spécifiquement à mon projet, nous avons vérifié si le peptide synthétique de 36 a.a. (motif EGF) et la CS étaient en mesure de mimer les effets préalablement observés chez les fibroblastes avec le milieu SSC complet. Nous avons découvert que la CS inhibe l'apoptose induite par la carence en sérum et ce pour une période de temps allant de 24 heures à 7 jours tandis que le motif

EGF est aussi capable de le faire, mais seulement pour une période de 24 heures. De plus, les mécanismes anti-apoptotiques activés par ces médiateurs miment ceux activés par le milieu SSC : à court terme la CS et le motifs EGF induisent un phénotype anti-apoptotique PI3K dépendant chez le fibroblaste caractérisé par une diminution de l'expression protéique de Bim tandis qu'à long terme, la CS induit un phénotype anti-apoptotique PI3K dépendant associé à une augmentation de l'expression protéique de Bcl-Xl. En ce qui concerne les mécanismes de différenciation myofibroblastique, à la fois le motif EGF et la CS sont en mesure d'induire une expression PI3K dépendante de la protéine  $\alpha$ -SMA, une protéine caractéristique aux myofibroblastes (283). Par contre, ces deux médiateurs ne sont pas en mesure d'induire une différenciation myofibroblastique aussi complète qu'avec le milieu SSC puisque nous n'avons pas pu détecter une augmentation de l'expression de desmine et une augmentation de la production de collagène de type I chez les fibroblastes qui en étaient exposés. Ceci suggère donc que d'autres médiateurs, non identifiés à ce jour, agissent en coopération avec le fragment du domaine V du perlécan pour induire un phénotype myofibroblastique plus spécialisé. On se doute bien aussi que l'effet anti-apoptotique apporté par notre milieu SSC doit être activé par d'autres médiateurs que le perlécan. À ce sujet, différentes études portant sur la caractérisation biochimique du SSC sont en cours au laboratoire. Notamment, nous cherchons à comparer les patrons de facteurs relâchés par les cellules endothéliales apoptotiques (SSC) versus les facteurs relâchés par des cellules endothéliales où l'activité caspase est bloquée (avec le zVAD-fmk) et ce, par une approche de gels 2D différentiels. Par ailleurs, nous pouvons formuler d'autres hypothèses quant aux rôles potentiels du fragment du

perlécan retrouvé dans le milieu SSC au sujet de la résistance à l'apoptose des fibroblastes et de la différenciation myofibroblastique. En effet, il est possible que la structure tridimensionnelle du fragment y ait un rôle à jouer. Comme nous avons utilisé un peptide synthétique de 36 a.a. représentant un motif EGF du domaine V du perlécan, nous ne savons pas encore si la structure réelle du motif a un effet sur notre système expérimental, par exemple sur l'expression de desmine ou sur la production de collagène de type I chez le myofibroblaste. Des études de clonage et de transfection sont présentement en cours au laboratoire pour évaluer l'importance de la structure tridimensionnelle du fragment du perlécan sur le comportement des fibroblastes. De plus, le fragment du domaine V du perlécan identifié dans notre milieu SSC comporte un motif homologue au domaine G de la laminine-1 qui pourrait aussi avoir des répercussions sur nos fibroblastes.

Il est intéressant de constater que le perlécan est un constituant majeur de la MEC principalement retrouvé au niveau de la membrane basale des vaisseaux sanguins, sur laquelle repose la couche de cellules endothéliales (183). Nous savons aussi que la membrane basale joue un rôle important sur les processus d'embryogénèse, de différenciation cellulaire et d'interactions cellule-MEC (178). Il devient alors facile d'imaginer que la cellule endothéliale *in vivo*, soumise à un stress pro-apoptotique (comme une insulte à l'endothélium), puisse activer des mécanismes protéolytiques qui mèneront au clivage du perlécan de la membrane basale, ce qui permettrait ensuite au fragment du domaine V d'interagir avec les cellules avoisinantes. Cette interaction cellule-MEC pourrait être en mesure d'induire les phénomènes de résistance à l'apoptose et de différenciation chez les

fibroblastes; phénomènes observés au laboratoire et normalement associés à plusieurs pathologies d'ordre fibrotique comme la MT et la SSc. Quant au rôle des fibroblastes dans ces mécanismes, nous savons qu'ils possèdent des récepteurs aux intégrines, lesquelles sont friandes d'éléments de la MEC et qui, pour certaines d'entre elles, ont déjà été répertoriées dans des effets anti-apoptotiques et pro-différenciation (227, 228). L'implication des intégrines dans notre système reste cependant à confirmer, mais l'utilisation d'anticorps bloquant dirigés spécifiquement contre les intégrines pourrait nous permettre d'y arriver dans un avenir rapproché. Chose certaine, les résultats présentés dans ce travail portant sur les effets du motif EGF et de la CS chez le fibroblaste ouvrent de nouvelles avenues sur des mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse pro-fibrotique activée suite à une atteinte endothéliale. La poursuite de ces études nous aidera à mieux comprendre la relation pathophysiologique entre l'apoptose des CE et le développement de la fibrose.

La MEC regorge d'éléments potentiellement actifs sur son environnement cellulaire (288, 289). À l'inverse la cellule regorge de mécanismes potentiellement actifs sur son environnement extérieur, soit la MEC. Les interactions exercées entre ces deux composantes sont essentielles au bon fonctionnement de ceux-ci et de l'être vivant qui en dépend. Les intégrines ont un rôle connu sur la survie de plusieurs types cellulaires (290). Plusieurs des voies de signalisation qui s'en trouvent activées ont été caractérisées, mais c'est la voie d'activation de la FAK qui attire le plus d'attention. Dans beaucoup de types cellulaires, l'activation de la FAK survient suite à la liaison des intégrines à la

MEC et entraîne subséquemment l'activation de la voie PI3K/Akt (258-260). À cet effet, l'intégrine B1 chez le fibroblaste a déjà été associée à ce type de mécanisme (228). D'autres études ont par ailleurs montré l'importance de la régulation des protéines apoptotiques Bim et Bit1 dans les mécanismes de survie cellulaire intégrine dépendants (257, 290). Plus spécifiquement, le récepteur EGF a déjà été impliqué dans l'inhibition de l'expression protéique de Bim dans des processus anti-apoptotiques intégrine dépendants (257), ce qui fait un étrange parallèle avec nos résultats. Donc, en regard avec les résultats présentés dans ce travail, nous pouvons suggérer qu'un ou des récepteurs intégrines soient responsables de la régulation moléculaire de l'effet anti-apoptotique apporté par les médiateurs issus de CE apoptotiques sur les fibroblastes. En effet, la voie PI3K identifiée comme un joueur important dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste et la caractérisation d'un fragment du domaine V du perlécan (soit un élément de la MEC) comme un des médiateurs actifs contenus dans le milieu SSC sont deux faits appuyant notre hypothèse. Quant au phénomène de différenciation myofibroblastique, il pourrait lui aussi être dépendant de l'action des intégrines. Il est en fait connu que le myofibroblaste a besoin de s'agripper à la MEC pour se différencier complètement (112). L'étude publiée dernièrement par Thannickal *et al.* va aussi en ce sens où il montre que la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-B1 est dépendante de l'activation de la FAK via l'action des intégrines au niveau de l'adhésion cellulaire (figure 4) (227). En ce qui concerne nos résultats obtenus sur l'activité du fragment du domaine V du perlécan (motif EGF et CS) et sur les concentrations de TGF-B1 retrouvées dans nos milieux de culture, nous nous proposons de modifier

quelque peu la représentation schématique proposée par Thannickal *et al.* au sujet des processus de différenciation myofibroblastique. Brièvement, notre milieu conditionné par des CE apoptotiques est en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique suite à une interaction cellule-MEC. S'en suit une activation de la FAK, de la voie PI3K/Akt et des processus caractéristiques de la différenciation myofibroblastique qui en découlent comme, par exemple, l'expression de TGF- $\beta$ 1 et d'  $\alpha$ -SMA et l'augmentation des fibres de stress. L'infime quantité de TGF- $\beta$ 1 ainsi produite pourrait amplifier, par une boucle autocrine, les processus de différenciation myofibroblastique pour favoriser un phénotype plus spécialisé ou tout simplement plus stable (figure 5). Ceci reste cependant un modèle hypothétique, mais nous sommes en voie de le confirmer d'autant plus que l'inhibition de la FAK semble atténuer l'effet anti-apoptotique chez les fibroblastes exposés au milieu SSC (données non publiées, Laplante 2004). Son rôle sur la différenciation myofibroblastique n'a pas encore été évalué.

La MEC regorge aussi de facteurs de croissance qui sont en mesure d'influencer certaines fonctions cellulaires. En fait, la MEC joue un rôle actif dans la mobilisation des molécules de croissance qui viendront réguler le comportement des cellules environnantes en plus de jouer un rôle passif dans la séquestration de ces dits facteurs (235). La MEC est capable de contrôler la diffusion de facteurs solubles permettant alors un approvisionnement local constant de molécules biologiquement actives et ce, même sans la production de nouveaux facteurs (235). Les facteurs de croissance normalement retrouvés au niveau de la MEC ont la capacité de s'y lier grâce à certains protéoglycans portant

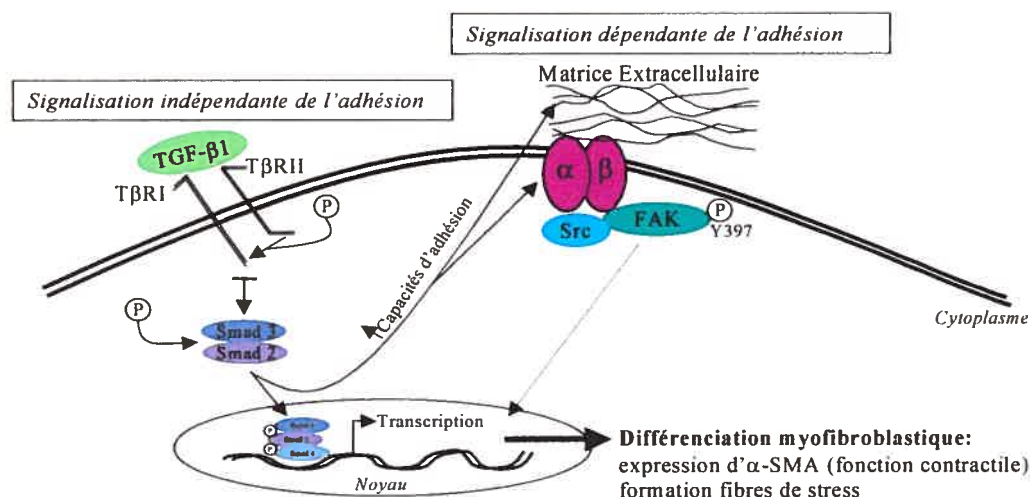


Figure 4. Représentation schématique proposée par Thannickal *et al* sur la différenciation myofibroblastique induite par le TGF-β1 (227). La liaison du TGF-β1 à la cellule fibroblastique entraîne la dimérisation et l'activation du récepteur spécifique au TGF-β1. S'en suivra une activation et phosphorylation rapide des protéines Smad qui agiront ensuite à titre de facteurs transcriptionnels sur l'expression de gènes propres à la différenciation myofibroblastique. D'autres voies indépendantes aux Smad, non identifiées à ce jour, pourraient aussi être activées dans ces processus. Par contre, l'activation et la phosphorylation de la FAK dépend de l'activation des Smad et est associée à l'expression des sous-unités intégrines et à la production de collagène et de fibronectine, le tout étant médié par la liaison du TGF-β1 à son récepteur. La signalisation par les intégrines via l'activation de la FAK est essentielle à l'établissement d'un phénotype myofibroblastique stable.

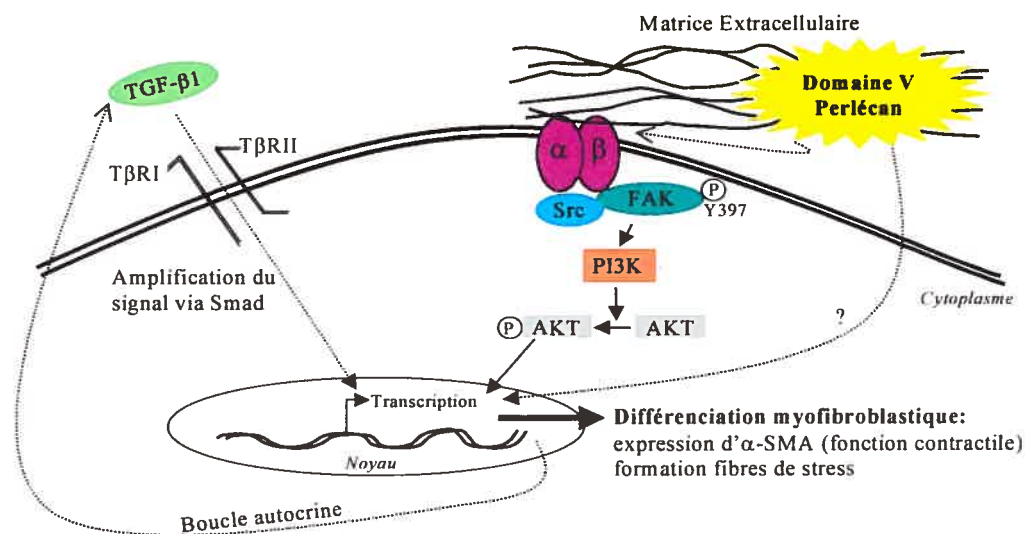


Figure 5. Modèle hypothétique adapté de Thannickal *et al.* sur la différenciation myofibroblastique induite par les médiateurs issus de CE apoptotiques. Nous proposons ici que le TGF-B1 pourrait agir à titre de support ou d'amplificateur aux processus de différenciation myofibroblastique induits par le motif EGF et la sulfate de chondroïtine, soient deux médiateurs présents sur le fragment C-terminal du domaine V du perlécan retrouvé dans notre milieu SSC. En fait, la liaison d'un de ces médiateurs, qui sont en fait des constituants de la MEC, à la cellule fibroblastique serait en mesure d'activer la voie de signalisation intégrine dépendante menant à l'activation de la FAK, de la PI3K et à la phosphorylation de Akt qui pourra ensuite agir à titre de facteur transcriptionnel sur l'expression de gènes caractéristiques au myofibroblaste. Dans notre système expérimental, l'activité PI3K est essentielle à la différenciation myofibroblastique. Nous avons par ailleurs détecté que nos fibroblastes étaient en mesure de sécréter un peu de TGF-B1 qui est initialement absent du milieu de culture. Il est donc possible que la liaison du fibroblaste à l'un de nos médiateurs présents dans le milieu SSC



active la voie intégrine dépendante pour favoriser la production de TGF- $\beta$ 1 qui, par une boucle autocrine, viendra amplifier ou appuyer les mécanismes de différenciation myofibroblastique. Il faut aussi considérer la possibilité que les médiateurs présents dans le milieu SSC puissent induire la différenciation myofibroblastique par des voies de signalisation que nous n'avons pas encore étudiées.

des chaînes latérales composées de glycosaminoglycans (291). Pour être actifs, certains facteurs de croissance comme le TGF-B1 et le PDGF ont besoin d'être clivés suite à une protéolyse de la matrice (292). Cependant, des fragments de la MEC peuvent aussi être clivés suite à cette protéolyse et certains d'entre eux, comme nous le proposons ici avec le perlécan, ont une activité biologique reconnue (267, 293). Il est convenu de penser que ces observations supportent l'idée que les facteurs de croissance et les protéines de la MEC collaborent ensemble de façon à créer des environnements cellulaires distincts qui régulent des processus biologiques comme la prolifération, l'apoptose et la différenciation (235). La conséquence biologique de cette collaboration est déterminée par le contrôle de la relâche des facteurs bioactifs. En se fiant aux différentes composantes de la MEC et aux différents facteurs de croissance, on peut imaginer une grande variété et complexité d'interactions entre la cellule et la MEC. En ce sens, les résultats présentés dans ce travail ne devraient représenter qu'une partie des conséquences de l'apoptose endothéliale sur la relâche de médiateurs solubles actifs sur son environnement. D'autres facteurs présents dans le milieu SSC, que nous tenterons d'identifier, pourraient avoir des activités biologiques spécifiques sur le comportement des fibroblastes. Certains d'entre eux pourraient, en effet, être responsables de l'expression de la desmine et de la production de collagène de type I chez le myofibroblaste. La réponse du fibroblaste exposé aux médiateurs issus de CE apoptotiques est sans aucun doute plus complexe que celle décrite dans ce travail, mais nous travaillons toujours à la définir davantage. Nos résultats suggèrent donc que l'apoptose des CE représente un mécanisme permettant l'induction de la protéolyse de la MEC qui a son tour libère des facteurs bioactifs

sur la résistance à l'apoptose des fibroblastes et sur la différenciation myofibroblastique, soient deux processus caractéristiques au remodelage tissulaire normal. En fait, l'apoptose des CE constitue une étape initiale dans les processus de réparation normaux, mais la production constante des facteurs issus de cette apoptose devient alors potentiellement responsable du développement de pathologies à caractère fibrotique comme la sclérose systémique.

Les caractéristiques de la SSc font un parallèle plus qu'intéressant avec les résultats obtenus dans ce travail quant à la résistance à l'apoptose des fibroblastes et la différenciation myofibroblastique induites par les médiateurs issus de CE apoptotiques. L'ensemble des mécanismes responsables de ces effets, qui ont été caractérisés dans ce projet de maîtrise, s'apparente aux mécanismes responsables du développement de la fibrose chez les gens atteints de SSc et ce, à partir du tout début du processus. Bien que le développement de cette maladie s'effectue en plusieurs étapes, il a été montré que l'apoptose des cellules endothéliales constitue un événement pathogénique primaire dans l'établissement de la réponse fibrotique subséquente (151, 294). La relation exacte entre les anomalies de l'endothélium et le comportement pathologique des fibroblastes n'est pas tout à fait connue, mais nos résultats obtenus au laboratoire peuvent nous apporter quelques indices à ce sujet. Nous avons vérifié si les médiateurs caractérisés dans notre milieu conditionné par des CE apoptotiques, soient la CS et le motif EGF, étaient en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique chez des fibroblastes issus de lésions de patients atteints de sclérodermie. Cette expérience avait pour but d'évaluer l'importance clinique potentielle de nos médiateurs sur la fibrogénèse.

Nous avons, en fait, montré que ces fibroblastes sclérodermiques disposent d'une sensibilité accrue à l'activité anti-apoptotique des médiateurs (CS et motif EGF) en comparaison avec des fibroblastes issus de contrôles normaux. Il est connu que la survie prolongée des fibroblastes en SSc mène à une augmentation du nombre de cellules fibroblastiques et à une augmentation de la déposition d'éléments de la MEC causant ainsi la progression de la fibrose (163). À cet effet, la CS et le motif EGF doivent être considérés comme des suspects potentiels dans l'établissement des processus fibrotiques puisqu'ils sont en mesure d'induire un phénotype de résistance à l'apoptose au niveau de fibroblastes normaux et sclérodermiques en plus d'induire la différenciation myofibroblastique. D'autres parallèles intéressants peuvent aussi être faits entre nos résultats et la littérature existante au sujet de la sclérose systémique. Entre autres : tout comme les fibroblastes issus de patients atteints de SSc, nos fibroblastes WI-38 exposés aux médiateurs issus de CE apoptotiques sont en mesure de sécréter davantage de collagène de type I (158). Aussi, Jun *et al.* ont montré une augmentation de l'activation de Akt chez les fibroblastes issus de patients sclérodermiques en comparaison avec des fibroblastes normaux. De notre côté, nous avons aussi détecté une augmentation de l'activation de Akt chez les fibroblastes exposés au milieu conditionné par des CE apoptotiques. Dans les deux cas, la voie PI3K/Akt a été impliquée dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste (136).

Les résultats présentés dans ce travail suggèrent que l'apoptose des CE mène à la libération de médiateurs solubles actifs sur les constituants de la paroi vasculaire. En fait, notre système expérimental utilisé pour nos recherches nous

permet d'affirmer que l'apoptose des CE représente un facteur initial important dans les processus de réparation tissulaire normaux et pathologiques. Ainsi, l'apoptose des CE permet à la fois le retrait de la cellule destinée à mourir et à la fois la protéolyse de la MEC. Cette protéolyse permet la libération de facteurs bioactifs sur les fibroblastes, ce qui se caractérise par l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique et par une différenciation myofibroblastique, le tout sous contrôle de la voie PI3K/Akt. Le fibroblaste peut alors effectuer son travail au niveau du tissu en réparation où il participera au remodelage de la MEC endommagée pour finalement disparaître et laisser place à une cicatrisation normale. Cependant, une activation excessive de ces mécanismes, soit par une production persistante de médiateurs issus de l'apoptose endothéliale ou soit par une sensibilité accrue des fibroblastes à ces médiateurs, serait source de pathologies fibrotiques comme la SSc où le fibroblaste ne cesse de remodeler la MEC.

## 5. CONCLUSION

L'apoptose des cellules endothéliales est répertoriée comme un évènement déclencheur initial impliqué dans une multitude de pathologies comme l'athérosclérose, la MT et la SSc (136). Comme nous l'avons démontré au laboratoire, les CE apoptotiques ont aussi la capacité d'induire, de par une production autocrine et paracrine de médiateurs solubles, des processus de réparation normaux suite à une insulte endothéliale et ce, au niveau des CE, des CML et des fibroblastes où chaque type cellulaire a une fonction spécifique dans ces mécanismes. Cependant, une activation soutenue de l'apoptose endothéliale peut mener à une production excessive de médiateurs pro-réparation qui pourront alors être considérés comme pro-fibrotiques et responsables du développement des pathologies ci-haut mentionnées. En fait, il y sera possible d'observer un remodelage tissulaire perpétuel qui se caractérisera par une production excessive de MEC menant au développement de la fibrose. Les fibroblastes jouent d'ailleurs un rôle important au niveau de cette réponse.

Nos résultats présentés dans ce travail améliorent la compréhension des mécanismes impliqués dans la fibrose vasculaire et la fibrose en général. Nos résultats permettent maintenant de lier l'apoptose des cellules endothéliales avec le développement de certains processus fibrotiques. En fait, il est connu que la différenciation persistante de fibroblastes en myofibroblastes et le manque d'apoptose de ces constituants cellulaires durant la phase finale de réparation du tissu sont impliqués dans l'initiation de la fibrose vasculaire suite à une insulte endothéliale. Les mécanismes impliqués dans ces processus n'ont jamais été bien caractérisés. Notre groupe a identifié un fragment du domaine V du perlécan

comme l'un des médiateurs bioactifs présents dans le milieu conditionné par des cellules endothéliales apoptotiques. Un motif EGF et la sulfate de chondroïtine présents sur ce fragment sont en mesure d'induire un phénomène de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes en plus d'induire la différenciation myofibroblastique. Nous avons aussi isolé une importante voie de signalisation impliquée dans ces processus, soit la voie PI3K/Akt, ce qui offre une bonne cible thérapeutique pour la régulation du comportement des fibroblastes. Une réparation fructueuse de l'endothélium pourrait alors être favorisée tout en limitant le développement de la fibrose du fait que le comportement des CE, des CML et des fibroblastes face aux médiateurs présents dans le milieu SSC est régit par différentes voies de signalisation (respectivement PKC, MAPK et PI3K telles que mentionnées plus tôt), ce qui offre plusieurs avenues thérapeutiques. En ce qui attrait à l'étude présentée dans ce travail, la voie PI3K/Akt influence à la fois les niveaux protéiques de Bim et de Bcl-Xl de façon à induire la résistance à l'apoptose chez le fibroblaste et les niveaux protéiques d'  $\alpha$ -SMA caractéristiques à la différenciation myofibroblastique.

Selon nos résultats, les cellules endothéliales apoptotiques libèrent un fragment du domaine V du perlécan d'une façon caspase dépendante, mais l'identité exacte de l'enzyme responsable du clivage du perlécan n'est pas encore connue. Par ailleurs, les cellules endothéliales apoptotiques doivent assurément libérer d'autres médiateurs bioactifs sur leur environnement qui n'ont pas encore été caractérisés. Chose certaine, la compréhension des mécanismes impliqués dans la relâche des facteurs solubles de réparation en plus de la caractérisation de ces dits facteurs et



de leurs mécanismes d'action sur les constituants de la paroi vasculaire nous offriront une opportunité unique de développer de nouvelles stratégies visant à encourager une réparation tissulaire efficace et à inhiber le remodelage pathologique.

C'est donc à ce titre que je mentionnais plus tôt que l'apoptose ne doit plus être considérée comme un processus de mort cellulaire silencieux, mais bien comme un processus actif sur son environnement. Il est clair qu'au cours des années, les organismes vivants, dont nous faisons partie, ont développé des mécanismes de protection contre l'insulte. En fait, l'apoptose des cellules endothéliales et les répercussions paracrines de ce suicide que nous avons observées chez les fibroblastes dans cette étude en sont un bon exemple. Par contre, une chronicité de l'insulte au niveau de l'endothélium pourrait potentialiser la relâche de facteurs paracrins ce qui perpétuera l'activité du remodelage vasculaire, le tout favorisant le développement de la fibrose.

## 6. RÉFÉRENCES

1. Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770.
2. Ameisen, J. C. 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9:367.
3. Leist, M., and M. Jaattela. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589.
4. Reed, J. C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157:1415.
5. Nicholson, D. W., and N. A. Thornberry. 2003. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 299:214.
6. Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397.
7. Formigli, L., L. Papucci, A. Tani, N. Schiavone, A. Tempestini, G. E. Orlandini, S. Capaccioli, and S. Z. Orlandini. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41.
8. Van Cruchten, S., and W. Van Den Broeck. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31:214.
9. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239.
10. Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445.
11. Wyllie, A. H., J. F. Kerr, and A. R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251.

12. Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207.
13. Wyllie, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555.
14. Roy, C., D. L. Brown, J. E. Little, B. K. Valentine, P. R. Walker, M. Sikorska, J. Leblanc, and N. Chaly. 1992. The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 200:416.
15. Yuan, J. 1997. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 9:247.
16. Kaufmann, S. H., and M. O. Hengartner. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526.
17. Bratton, S. B., and G. M. Cohen. 2001. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 22:306.
18. Earnshaw, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383.
19. Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312.
20. Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269.

21. Grutter, M. G. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10:649.
22. Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926.
23. Lamkanfi, M., W. Declercq, M. Kalai, X. Saelens, and P. Vandenabeele. 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9:358.
24. Cryns, V., and J. Yuan. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551.
25. Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman, and D. W. Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272:17907.
26. Nagata, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256:12.
27. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96.
28. Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175.
29. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43.

30. Buendia, B., A. Santa-Maria, and J. C. Courvalin. 1999. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 11):1743.
31. Rao, L., D. Perez, and E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135:1441.
32. Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski, and L. T. Williams. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294.
33. Rudel, T., and G. M. Bokoch. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571.
34. Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe, and C. M. Croce. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440.
35. Antonsson, B., and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256:50.
36. Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322.
37. Green, D. R., and J. C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309.
38. Allsopp, T. E., S. Wyatt, H. F. Paterson, and A. M. Davies. 1993. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73:295.

39. Minn, A. J., C. M. Rudin, L. H. Boise, and C. B. Thompson. 1995. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86:1903.
40. Veis, D. J., C. M. Sorenson, J. R. Shutter, and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229.
41. Krajewski, S., M. Krajewska, A. Shabaik, H. G. Wang, S. Irie, L. Fong, and J. C. Reed. 1994. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54:5501.
42. Raina, D., S. Kharbanda, and D. Kufe. 2004. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* 279:20607.
43. Shimizu, S., Y. Shinohara, and Y. Tsujimoto. 2000. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19:4309.
44. Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, E. K. Williamson, P. T. Schumacker, and C. B. Thompson. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91:627.
45. Fang, G., B. S. Chang, C. N. Kim, C. Perkins, C. B. Thompson, and K. N. Bhalla. 1998. "Loop" domain is necessary for taxol-induced mobility shift and phosphorylation of Bcl-2 as well as for inhibiting taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis. *Cancer Res* 58:3202.
46. Ibrado, A. M., Y. Huang, G. Fang, L. Liu, and K. Bhalla. 1996. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and

apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 56:4743.

47. Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307.

48. Nakano, K., and K. H. Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683.

49. Bouillet, P., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, H. Puthalakath, L. O'Connor, S. Cory, J. M. Adams, and A. Strasser. 2000. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. *Ann N Y Acad Sci* 926:83.

50. Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King, and A. Strasser. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287.

51. Reed, J. C. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773.

52. Ferri, K. F., and G. Kroemer. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3:E255.

53. Prives, C., and P. A. Hall. 1999. The p53 pathway. *J Pathol* 187:112.

54. Ko, L. J., and C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054.

55. Kroemer, G., and J. C. Reed. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513.

56. Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95.

57. Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R.



- Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441.
58. Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33.
59. Chai, J., C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang, and Y. Shi. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855.
60. Deveraux, Q. L., and J. C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239.
61. Lorenzo, H. K., S. A. Susin, J. Penninger, and G. Kroemer. 1999. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6:516.
62. Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J. M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549.
63. Loeffler, M., and G. Kroemer. 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256:19.
64. Liu, X., P. Li, P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W. T. Garrard, and X. Wang. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8461.

65. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479.
66. Saleh, A., S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel, and E. S. Alnemri. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 274:17941.
67. Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549.
68. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22:155.
69. Horvitz, H. R. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59:1701s.
70. Salvesen, G. S., and V. M. Dixit. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964.
71. Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276:4812.
72. Bertin, J., W. J. Nir, C. M. Fischer, O. V. Tayber, P. R. Errada, J. R. Grant, J. J. Keilty, M. L. Gosselin, K. E. Robison, G. H. Wong, M. A. Glucksmann, and P. S. DiStefano. 1999. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274:12955.

73. Poyet, J. L., S. M. Srinivasula, M. Tnani, M. Razmara, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri. 2001. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276:28309.
74. Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59:1693s.
75. Yin, X. M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth, and S. J. Korsmeyer. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400:886.
76. Krammer, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789.
77. Yang, X., H. Y. Chang, and D. Baltimore. 1998. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281:1355.
78. Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1.
79. Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491.
80. Schendel, S. L., R. Azimov, K. Pawlowski, A. Godzik, B. L. Kagan, and J. C. Reed. 1999. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 274:21932.
81. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481.
82. Foghsgaard, L., D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist, and M. Jaattela. 2001. Cathepsin B acts as a dominant

execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153:999.

83. Jaattela, M., D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki, and M. Egeblad. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J* 17:6124.

84. Lacana, E., J. K. Ganjei, P. Vito, and L. D'Adamio. 1997. Dissociation of apoptosis and activation of IL-1 $\beta$ -converting enzyme/Ced-3 proteases by ALG-2 and the truncated Alzheimer's gene ALG-3. *J Immunol* 158:5129.

85. Wright, S. C., U. Schellenberger, H. Wang, D. H. Kinder, J. W. Talhouk, and J. W. Larrick. 1997. Activation of CPP32-like proteases is not sufficient to trigger apoptosis: inhibition of apoptosis by agents that suppress activation of AP24, but not CPP32-like activity. *J Exp Med* 186:1107.

86. Harvey, K. J., D. Lukovic, and D. S. Ucker. 2000. Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol* 148:59.

87. Elliott, K., K. Ge, W. Du, and G. C. Prendergast. 2000. The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* 19:4669.

88. McCarthy, N. J., M. K. Whyte, C. S. Gilbert, and G. I. Evan. 1997. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136:215.

89. Leist, M., B. Single, H. Naumann, E. Fava, B. Simon, S. Kuhnle, and P. Nicotera. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* 249:396.

90. Nicotera, P., M. Leist, and L. Manzo. 1999. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20:46.
91. Leist, M., and M. Jaattela. 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8:324.
92. Deiss, L. P., H. Galinka, H. Berissi, O. Cohen, and A. Kimchi. 1996. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *Embo J* 15:3861.
93. Roberg, K. 2001. Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 81:149.
94. Guicciardi, M. E., J. Deussing, H. Miyoshi, S. F. Bronk, P. A. Svingen, C. Peters, S. H. Kaufmann, and G. J. Gores. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106:1127.
95. Schotte, P., W. Van Crielinge, M. Van de Craen, G. Van Loo, M. Desmedt, J. Grooten, M. Cornelissen, L. De Ridder, J. Vandekerckhove, W. Fiers, P. Vandenabeele, and R. Beyaert. 1998. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun* 251:379.
96. Stoka, V., B. Turk, S. L. Schendel, T. H. Kim, T. Cirman, S. J. Snipas, L. M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J. C. Reed, X. M. Yin, V. Turk, and G. S. Salvesen. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276:3149.
97. Lemasters, J. J., T. Qian, C. A. Bradham, D. A. Brenner, W. E. Cascio, L. C. Trost, Y. Nishimura, A. L. Nieminen, and B. Herman. 1999. Mitochondrial

dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 31:305.

98. Alison, M. R., and C. E. Sarraf. 1994. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 35:577.

99. Trump, B. F., P. J. Goldblatt, and R. E. Stowell. 1965. Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and lipid droplets. *Lab Invest* 14:2000.

100. Alam, J. J. 2003. Apoptosis: target for novel drugs. *Trends Biotechnol* 21:479.

101. Munsch, B., G. Lizard, S. Gueldry, and P. Gamber. 1995. [Agents inducing cell death of the vascular wall]. *Ann Biol Clin (Paris)* 53:473.

102. Cines, D. B., E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A. M. Schmidt, and D. M. Stern. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527.

103. Sartore, S., A. Chiavegato, E. Faggin, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni, and P. Pauletto. 2001. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 89:1111.

104. McCarthy, N. J., and M. R. Bennett. 2000. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res* 45:747.

105. Owens, G. K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75:487.

106. Stenmark, K. R., and R. P. Mecham. 1997. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 59:89.
107. Schwartz, S. M., D. deBlois, and E. R. O'Brien. 1995. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 77:445.
108. Sartore, S., R. Franch, M. Roelofs, and A. Chiavegato. 1999. Molecular and cellular phenotypes and their regulation in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134:235.
109. Glass, C. K., and J. L. Witztum. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503.
110. Yee, K. O., and S. M. Schwartz. 1999. Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 82:762.
111. Shi, Y., J. E. O'Brien, Jr., L. Ala-Kokko, W. Chung, J. D. Mannion, and A. Zalewski. 1997. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* 95:997.
112. Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349.
113. Phan, S. H. 2002. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122:286S.
114. Zalewski, A., and Y. Shi. 1997. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:417.
115. Wilcox, J. N., and N. A. Scott. 1996. Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. *Int J Cardiol* 54 Suppl:S21.
116. Faggin, E., M. Puato, L. Zardo, R. Franch, C. Millino, F. Sarinella, P. Pauletto, S. Sartore, and A. Chiavegato. 1999. Smooth muscle-specific SM22

protein is expressed in the adventitial cells of balloon-injured rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1393.

117. Lin, Y. S., C. F. Lin, H. Y. Lei, H. S. Liu, T. M. Yeh, S. H. Chen, and C. C. Liu. 2004. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr Pharm Des* 10:213.

118. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115.

119. Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233.

120. Ido, Y., D. Carling, and N. Ruderman. 2002. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 51:159.

121. Harada-Shiba, M., M. Kinoshita, H. Kamido, and K. Shimokado. 1998. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 273:9681.

122. Walford, G. A., R. L. Moussignac, A. W. Scribner, J. Loscalzo, and J. A. Leopold. 2004. Hypoxia potentiates nitric oxide-mediated apoptosis in endothelial cells via peroxynitrite-induced activation of mitochondria-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 279:4425.

123. Bordron, A., M. Dueymes, Y. Levy, C. Jamin, J. P. Leroy, J. C. Piette, Y. Shoenfeld, and P. Y. Youinou. 1998. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 101:2029.

124. Shen, Y. H., X. L. Wang, and D. E. Wilcken. 1998. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 433:125.



125. Lee, V. Y., D. S. McClintock, M. T. Santore, G. R. Budinger, and N. S. Chandel. 2002. Hypoxia sensitizes cells to nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277:16067.
126. Santore, M. T., D. S. McClintock, V. Y. Lee, G. R. Budinger, and N. S. Chandel. 2002. Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L727.
127. Dong, C., J. E. Wilson, G. L. Winters, and B. M. McManus. 1996. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest* 74:921.
128. Bochaton-Piallat, M. L., F. Gabbiani, M. Redard, A. Desmouliere, and G. Gabbiani. 1995. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol* 146:1059.
129. Choy, J. C., D. J. Granville, D. W. Hunt, and B. M. McManus. 2001. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 33:1673.
130. Geng, Y. J., and P. Libby. 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 147:251.
131. Scoazec, J. Y., and G. Lasèche. 1993. Immunologie des cellules endothéliales et rejet de greffe. *Médecine Science* 9:1094.
132. Laurence, J., and D. Mitra. 1997. Apoptosis of microvascular endothelial cells in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura/sporadic hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol* 34:98.

133. Morel-Maroger, L., A. Kanfer, K. Solez, J. D. Sraer, and G. Richet. 1979. Prognostic importance of vascular lesions in acute renal failure with microangiopathic hemolytic anemia (hemolytic-uremic syndrome): clinicopathologic study in 20 adults. *Kidney Int* 15:548.
134. Worda, M., R. Sgonc, H. Dietrich, H. Niederegger, R. S. Sundick, M. E. Gershwin, and G. Wick. 2003. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum* 48:2605.
135. Lunardi, C., C. Bason, R. Navone, E. Millo, G. Damonte, R. Corrocher, and A. Puccetti. 2000. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med* 6:1183.
136. Jun, J. B., M. Kuechle, J. M. Harlan, and K. B. Elkon. 2003. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 15:756.
137. Gabbiani, G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200:500.
138. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801.
139. Libby, P. 2000. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247:349.
140. Symmers, W. S. 1952. Thrombotic microangiopathic haemolytic anaemia (thrombotic microangiopathy). *Br Med J* 2:897.
141. Greeno, E. W., R. R. Bach, and C. F. Moldow. 1996. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest* 75:281.

142. Casciola-Rosen, L., A. Rosen, M. Petri, and M. Schlissel. 1996. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1624.
143. Bombeli, T., A. Karsan, J. F. Tait, and J. M. Harlan. 1997. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 89:2429.
144. Bombeli, T., B. R. Schwartz, and J. M. Harlan. 1999. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 93:3831.
145. Mitra, D., E. A. Jaffe, B. Weksler, K. A. Hajjar, C. Soderland, and J. Laurence. 1997. Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. *Blood* 89:1224.
146. Matsumae, T., S. Takebayashi, and S. Naito. 1996. The clinico-pathological characteristics and outcome in hemolytic-uremic syndrome of adults. *Clin Nephrol* 45:153.
147. Gagnadoux, M. F., R. Habib, M. C. Gubler, J. L. Bacri, and M. Broyer. 1996. Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol* 46:39.
148. Renaud, C., P. Niaudet, M. F. Gagnadoux, M. Broyer, and R. Habib. 1995. Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors in children over 3 years of age. *Pediatr Nephrol* 9:24.
149. Remuzzi, G., and P. Ruggenenti. 1995. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 48:2.

150. Habib, R., H. Mathieu, and P. Royer. 1967. [Hemolytic-uremic syndrome of infancy: 27 clinical and anatomic observations]. *Nephron* 4:139.
151. Sgonc, R., M. S. Gruschwitz, H. Dietrich, H. Recheis, M. E. Gershwin, and G. Wick. 1996. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 98:785.
152. Prescott, R. J., A. J. Freemont, C. J. Jones, J. Hoyland, and P. Fielding. 1992. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 166:255.
153. Fleischmajer, R., and J. S. Perlish. 1980. Capillary alterations in scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 2:161.
154. Flavahan, N. A., S. Flavahan, Q. Liu, S. Wu, W. Tidmore, C. M. Wiener, R. J. Spence, and F. M. Wigley. 2000. Increased  $\alpha_2$ -adrenergic constriction of isolated arterioles in diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 43:1886.
155. Levin, E. R. 1995. Endothelins. *N Engl J Med* 333:356.
156. Pearson, J. D. 1991. The endothelium: its role in scleroderma. *Ann Rheum Dis* 50 Suppl 4:866.
157. Sgonc, R. 1999. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int Arch Allergy Immunol* 120:169.
158. LeRoy, E. C. 1974. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 54:880.
159. Botstein, G. R., G. K. Sherer, and E. C. Leroy. 1982. Fibroblast selection in scleroderma. An alternative model of fibrosis. *Arthritis Rheum* 25:189.

160. Goldring, S. R., M. L. Stephenson, E. Downie, S. M. Krane, and J. H. Korn. 1990. Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 85:798.
161. Korn, J. H., P. V. Halushka, and E. C. LeRoy. 1980. Mononuclear cell modulation of connective tissue function: suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J Clin Invest* 65:543.
162. Kirk, T. Z., M. E. Mark, C. C. Chua, B. H. Chua, and M. D. Mayes. 1995. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 270:3423.
163. Jelaska, A., and J. H. Korn. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43:2230.
164. Korn, J. H. 1989. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1:479.
165. Mauch, C., and T. Krieg. 1990. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheum Dis Clin North Am* 16:93.
166. Santiago, B., M. Galindo, M. Rivero, and J. L. Pablos. 2001. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44:1667.
167. Brazil, D. P., and B. A. Hemmings. 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26:657.
168. Ricupero, D. A., C. F. Poliks, D. C. Rishikof, K. A. Cuttle, P. P. Kuang, and R. H. Goldstein. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of

alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C99.

169. Asano, Y., H. Ihn, K. Yamane, M. Jinnin, Y. Mimura, and K. Tamaki. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in alpha2(I) collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 172:7123.

170. Bashkin, P., S. Doctrow, M. Klagsbrun, C. M. Svahn, J. Folkman, and I. Vlodavsky. 1989. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28:1737.

171. Tortora, J., and N. Anagnostakos. 1988. Principes d'anatomie et de physiologie. 888p.

172. Bjorkerud, S., B. Bjorkerud, and M. Joelsson. 1994. Structural organization of reconstituted human arterial smooth muscle tissue. *Arterioscler Thromb* 14:644.

173. Corvol, P. 1993. L'endothélium, plaque tournante de la vasomotricité et de la trophicité de la paroi artérielle. *Médecine Science* 9:1031.

174. Pober, J. S., and R. S. Cotran. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70:427.

175. Davies, M. G., and P. O. Hagen. 1993. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 218:593.

176. Hebert, M. J., S. R. Gullans, H. S. Mackenzie, and H. R. Brady. 1998. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1beta-dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 152:523.

177. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. Watson. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3th:1361p.
178. Kallunki, P., and K. Tryggvason. 1992. Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 116:559.
179. Appella, E., I. T. Weber, and F. Blasi. 1988. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett* 231:1.
180. Mayer, U., E. Kohfeldt, and R. Timpl. 1998. Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction. *Ann N Y Acad Sci* 857:130.
181. Murdoch, A. D., G. R. Dodge, I. Cohen, R. S. Tuan, and R. V. Iozzo. 1992. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 267:8544.
182. Ruoslahti, E. 1988. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 4:229.
183. Friedrich, M. V., W. Gohring, M. Morgelin, A. Brancaccio, G. David, and R. Timpl. 1999. Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J Mol Biol* 294:259.
184. Noonan, D. M., A. Fulle, P. Valente, S. Cai, E. Horigan, M. Sasaki, Y. Yamada, and J. R. Hassell. 1991. The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin

A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 266:22939.

185. Battaglia, C., U. Mayer, M. Aumailley, and R. Timpl. 1992. Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* 208:359.

186. Sasaki, T., M. Costell, K. Mann, and R. Timpl. 1998. Inhibition of glycosaminoglycan modification of perlecan domain I by site-directed mutagenesis changes protease sensitivity and laminin-1 binding activity. *FEBS Lett* 435:169.

187. Groffen, A. J., C. A. Buskens, K. Tryggvason, J. H. Veerkamp, L. A. Monnens, and L. P. van den Heuvel. 1996. Expression and characterization of human perlecan domains I and II synthesized by baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem* 241:827.

188. Aviezer, D., D. Hecht, M. Safran, M. Eisinger, G. David, and A. Yayon. 1994. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79:1005.

189. Gohring, W., T. Sasaki, C. H. Heldin, and R. Timpl. 1998. Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur J Biochem* 255:60.

190. Hopf, M., W. Gohring, E. Kohfeldt, Y. Yamada, and R. Timpl. 1999. Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem* 259:917.



191. Brown, J. C., T. Sasaki, W. Gohring, Y. Yamada, and R. Timpl. 1997. The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* 250:39.
192. Timpl, R. 1993. Proteoglycans of basement membranes. *Experientia* 49:417.
193. Iozzo, R. V., I. R. Cohen, S. Grassel, and A. D. Murdoch. 1994. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 302 ( Pt 3):625.
194. Thyberg, J. 1998. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. *Histol Histopathol* 13:871.
195. Fuster, V., J. T. Fallon, and Y. Nemerson. 1996. Coronary thrombosis. *Lancet* 348 Suppl 1:s7.
196. Schwartz, S., and M. Reidy. 1996. Restenosis: an assessment of factors important in arterial occlusion. *Atherosclerosis and coronary artery disease*:701.
197. Hinz, B., D. Mastrangelo, C. E. Iselin, C. Chaponnier, and G. Gabbiani. 2001. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159:1009.
198. Lindahl, P., and C. Betsholtz. 1998. Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:21.
199. Martin, P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75.

200. Rubbia-Brandt, L., A. P. Sappino, and G. Gabbiani. 1991. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 60:73.
201. Desmouliere, A., L. Rubbia-Brandt, G. Grau, and G. Gabbiani. 1992. Heparin induces alpha-smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts. *Lab Invest* 67:716.
202. Powell, D. W., R. C. Miffli, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West. 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277:C1.
203. Serini, G., and G. Gabbiani. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250:273.
204. Grinnell, F. 2000. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends Cell Biol* 10:362.
205. Kreis, T. E., and W. Birchmeier. 1980. Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 22:555.
206. Burridge, K., and M. Chrzanowska-Wodnicka. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:463.
207. Singer, II, D. W. Kawka, D. M. Kazazis, and R. A. Clark. 1984. In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol* 98:2091.
208. Dugina, V., L. Fontao, C. Chaponnier, J. Vasiliev, and G. Gabbiani. 2001. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci* 114:3285.

209. Geiger, B., and A. Bershadsky. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13:584.
210. Chicurel, M. E., C. S. Chen, and D. E. Ingber. 1998. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol* 10:232.
211. Skalli, O., P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillesse, and G. Gabbiani. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787.
212. Darby, I., O. Skalli, and G. Gabbiani. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63:21.
213. Christen, T., V. Verin, M. Bochaton-Piallat, Y. Popowski, F. Ramaekers, P. Debruyne, E. Camenzind, G. van Eys, and G. Gabbiani. 2001. Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. *Circulation* 103:882.
214. Gabbiani, G., G. B. Ryan, and G. Majne. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27:549.
215. Zhang, H. Y., and S. H. Phan. 1999. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:658.
216. Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122:103.

217. Schnabl, B., Y. O. Kweon, J. P. Frederick, X. F. Wang, R. A. Rippe, and D. A. Brenner. 2001. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 34:89.
218. Borsi, L., P. Castellani, A. M. Risso, A. Leprini, and L. Zardi. 1990. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett* 261:175.
219. Ronnov-Jessen, L., and O. W. Petersen. 1993. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 68:696.
220. Vaughan, M. B., E. W. Howard, and J. J. Tomasek. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 257:180.
221. Kim, S. J., P. Angel, R. Lafyatis, K. Hattori, K. Y. Kim, M. B. Sporn, M. Karin, and A. B. Roberts. 1990. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 10:1492.
222. Schmid, P., P. Itin, G. Cherry, C. Bi, and D. A. Cox. 1998. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 152:485.
223. Matthey, D. L., P. T. Dawes, N. B. Nixon, and H. Slater. 1997. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis* 56:426.

224. Heldin, C. H., K. Miyazono, and P. ten Dijke. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465.
225. Massague, J., and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 19:1745.
226. Serini, G., M. L. Bochaton-Piallat, P. Ropraz, A. Geinoz, L. Borsi, L. Zardi, and G. Gabbiani. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142:873.
227. Thannickal, V. J., D. Y. Lee, E. S. White, Z. Cui, J. M. Larios, R. Chacon, J. C. Horowitz, R. M. Day, and P. E. Thomas. 2003. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278:12384.
228. Tian, B., K. Lessan, J. Kahm, J. Kleidon, and C. Henke. 2002. beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* 277:24667.
229. Bosman, F., and I. Stamenkovic. 2003. Preface to extracellular matrix and disease. *Journal of Pathology* 200:421.
230. Bosman, F. T., and I. Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200:423.
231. Hulmes, D. J. 2002. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol* 137:2.
232. Hulmes, D. J. 1992. The collagen superfamily--diverse structures and assemblies. *Essays Biochem* 27:49.

233. Kadler, K. E., D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem J* 316 ( Pt 1):1.
234. Ottani, V., M. Raspanti, and A. Ruggeri. 2001. Collagen structure and functional implications. *Micron* 32:251.
235. Rosso, F., A. Giordano, M. Barbarisi, and A. Barbarisi. 2004. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199:174.
236. Woessner, J., and H. Nagase. 2000. Matrix mettaloproteinases and TIMPs.
237. Greenwald, R., S. Zucker, and L. Golub. 1999. Inhibition of matrix mettaloproteinases: Therapeutic applications.
238. Sternlicht, M. D., and Z. Werb. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463.
239. Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161.
240. McCawley, L. J., and L. M. Matrisian. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13:534.
241. Nagase, H., and J. F. Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491.
242. Imai, K., A. Hiramatsu, D. Fukushima, M. D. Pierschbacher, and Y. Okada. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 322 ( Pt 3):809.
243. Whitelock, J. M., A. D. Murdoch, R. V. Iozzo, and P. A. Underwood. 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound

basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 271:10079.

244. Yu, Q., and I. Stamenkovic. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14:163.

245. Keely, P. J., A. M. Fong, M. M. Zutter, and S. A. Santoro. 1995. Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 2):595.

246. Prasad, N., R. S. Topping, and S. J. Decker. 2002. Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *J Cell Sci* 115:3807.

247. Couchman, J. R., L. Chen, and A. Woods. 2001. Syndecans and cell adhesion. *Int Rev Cytol* 207:113.

248. Turley, E. A., P. W. Noble, and L. Y. Bourguignon. 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 277:4589.

249. Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673.

250. Schwartz, M. A., and V. Baron. 1999. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr Opin Cell Biol* 11:197.

251. Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter, and P. van der Geer. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372:786.

252. Stoker, A. W., C. H. Streuli, M. Martins-Green, and M. J. Bissell. 1990. Designer microenvironments for the analysis of cell and tissue function. *Curr Opin Cell Biol* 2:864.
253. Miranti, C. K., and J. S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4:E83.
254. Giancotti, F. G. 2003. A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4:149.
255. Frisch, S. M., and R. A. Screaton. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13:555.
256. Frisch, S. M., and E. Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9:701.
257. Reginato, M. J., K. R. Mills, J. K. Paulus, D. K. Lynch, D. C. Sgroi, J. Debnath, S. K. Muthuswamy, and J. S. Brugge. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5:733.
258. Matter, M. L., and E. Ruoslahti. 2001. A signaling pathway from the  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha (v) \beta 3$  integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 276:27757.
259. Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne, and J. Downward. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J* 16:2783.
260. Frisch, S. M., K. Vuori, E. Ruoslahti, and P. Y. Chan-Hui. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 134:793.



261. del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera, and G. Nunez. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687.
262. Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318.
263. Chen, H. C., P. A. Appeddu, H. Isoda, and J. L. Guan. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 271:26329.
264. Lockshin, R. A., and Z. Zakeri. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:545.
265. Clarke, P. G., and S. Clarke. 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193:81.
266. Raymond, M. A., N. Vigneault, V. Luyckx, and M. J. Hebert. 2002. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291:261.
267. Raymond, M. A., A. Desormeaux, P. Laplante, N. Vigneault, J. G. Filep, K. Landry, A. V. Pshezhetsky, and M. J. Hebert. 2004. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* 18:705.
268. Hu, Y., H. Dietrich, B. Metzler, G. Wick, and Q. Xu. 2000. Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:18.

269. Guevara, N. V., H. S. Kim, E. I. Antonova, and L. Chan. 1999. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 5:335.
270. Pollman, M. J., J. L. Hall, M. J. Mann, L. Zhang, and G. H. Gibbons. 1998. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 4:222.
271. Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson, and N. A. Thornberry. 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273:32608.
272. Choi, K. S., I. K. Lim, J. N. Brady, and S. J. Kim. 1998. ICE-like protease (caspase) is involved in transforming growth factor beta1-mediated apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* 27:415.
273. Ruggenti, P., M. Noris, and G. Remuzzi. 2001. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 60:831.
274. D'Cruz, D. 2000. Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol Lett* 112-113:421.
275. Yamamoto, T., and K. Nishioka. 2004. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 122:44.
276. Mailloux, A., K. Grenet, A. Bruneel, B. Beneteau-Burnat, M. Vaubourdolle, and B. Baudin. 2001. Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. *Eur J Cell Biol* 80:442.
277. McManus, M. T., and P. A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3:737.

278. Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens, and G. Kroemer. 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184:1331.
279. Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129.
280. Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147.
281. Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green, and D. D. Newmeyer. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132.
282. Kuo, M. L., and N. C. Yang. 1995. Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun* 212:767.
283. Gabbiani, G. 1998. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res* 38:545.
284. Sappino, A. P., W. Schurch, and G. Gabbiani. 1990. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 63:144.
285. Kim, G., J. B. Jun, and K. B. Elkon. 2002. Necessary role of phosphatidylinositol 3-kinase in transforming growth factor beta-mediated activation of Akt in normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46:1504.

286. Bakin, A. V., A. K. Tomlinson, N. A. Bhowmick, H. L. Moses, and C. L. Arteaga. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275:36803.
287. Iozzo, R. V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609.
288. Kalluri, R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3:422.
289. Iozzo, R. V., and J. D. San Antonio. 2001. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 108:349.
290. Jan, Y., M. Matter, J. T. Pai, Y. L. Chen, J. Pilch, M. Komatsu, E. Ong, M. Fukuda, and E. Ruoslahti. 2004. A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell* 116:751.
291. Huhtala, M. T., O. T. Pentikainen, and M. S. Johnson. 1999. A dimeric ternary complex of FGFR [correction of FGFR1], heparin and FGF-1 leads to an 'electrostatic sandwich' model for heparin binding. *Structure Fold Des* 7:699.
292. Dallas, S. L., K. Miyazono, T. M. Skerry, G. R. Mundy, and L. F. Bonewald. 1995. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol* 131:539.
293. Mongiat, M., S. M. Sweeney, J. D. San Antonio, J. Fu, and R. V. Iozzo. 2003. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem* 278:4238.

294. Schachna, L., and F. M. Wigley. 2002. Targeting mediators of vascular injury in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 14:686.

